



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO MOLECULAR DE AISLADOS MARINOS DEL
GÉNERO *Micromonospora***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

FABIOLA PATIÑO CASTELLANOS



MÉXICO, D.F.

2011



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: ADRIANA GUADALUPE MEJÍA CHÁVEZ.

VOCAL. Profesor: EDUARDO BONILLA ESPINOSA.

SECRETARIO. Profesor: LUIS ÁNGEL MALDONADO MANJARREZ.

1° SUPLENTE. Profesor: ALEJANDRO CAMACHO CRUZ.

2° SUPLENTE. Profesor: NORMA ANGÉLICA CASTELLANOS CHÁVEZ.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ciencias del Mar y
Limnología, Laboratorio de Recursos Microbianos, Ciudad Universitaria,
México D.F.

ASESOR DEL TEMA: Luis Ángel Maldonado Manjarrez. _____

SUSTENTANTE: Fabiola Patiño Castellanos. _____

*“No estudio por saber más,
sino por ignorar menos”*

Sor Juana Inés de la Cruz

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada quiero agradecer a Dios porque me ha brindado todo lo necesario para ser una persona plena.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química porque estoy orgullosa de haber formado parte de una de sus generaciones de estudiantes.

Agradezco al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Ciudad Universitaria UNAM por el uso de sus instalaciones para la realización del presente trabajo de investigación.

Al Dr. Luis Ángel Maldonado por haberme permitido integrarme a su equipo de trabajo, por todo el conocimiento que me brindó y sobre todo por su apoyo.

Quiero agradecer a mi mamá porque sin su paciencia, tolerancia, apoyo y cariño no estaría en donde estoy.

A mi papá por los valores que me inculco y por haberme proporcionado una buena educación, por su paciencia y por todo el cariño que siempre me ha dedicado.

Agradezco a mis hermanas Cin, Ady y Liz por la solidaridad y el amor que nos tenemos.

A mi novio por ser una parte de mi, por haber estado a mi lado todos estos años apoyándome, animándome y demostrándome todo su cariño.

Gracias a mi prima Chabe por haberme ayudado con la parte de diseño de algunas tareas.

Agradezco a mis compañeros de la Facultad especialmente a mis grandes amigas: Karla, Janet, Anita, Gaby, Xo, Clau y Ale por todos los buenos momentos que me hicieron pasar.

Agradezco a todos los profesores que de la Facultad de Química que contribuyeron en mi formación académica, primordialmente a Alejandro Camacho por el apoyo que me ha brindado.

Por último quiero agradecer al mis sinodales Adriana Mejía y Eduardo Bonilla por haber colaborado con la revisión del presente trabajo.

Gracias

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 Importancia de la microbiología marina y la biología molecular	8
1.2 La clase Actinobacteria	11
1.3 El género <i>Micromonospora</i>	14
1.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	16
1.5 Empleo de oligos específicos para la identificación bacteriana	19
1.5.1 Gen 16S rRNA	19
1.5.2 Aplicación de oligos para la identificación bacteriana	22
1.6 Técnicas moleculares basadas en PCR	23
1.6.1 Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados	23
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
3. OBJETIVOS	30
4. HIPÓTESIS	30
5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	31
5.1 Materiales y métodos	32
5.2 Origen de las muestras y DNA	32
5.3 PCR para caracterizar a nivel género	32
5.3.1 Electroforesis horizontal, agarosa al 1 %	33
5.4 AFLP	35
5.4.1 Reacción de digestión y ligación de adaptadores	35
5.4.2 PCR AFLP	36
5.4.3 Electroforesis horizontal, agarosa al 1.5 %	37
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
6.1 Identificación específica del género	39
6.2 Discriminación entre aislados de <i>Micromonospora</i>	41
6.2.1 Oligo AF1	44
6.2.2 Oligo AF2	44

6.2.3 Oligo AF3	47
7. CONCLUSIONES	49
8. PERSPECTIVAS	50
9. BIBLIOGRAFÍA	51
10. REFERENCIAS	58

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia de la microbiología marina y la biología molecular

Por muchos años se consideró que el suelo y el agua dulce eran el mayor reservorio de microorganismos sin tomar en cuenta que la tierra y el agua dulce varían significativamente en (a) su estructura física y química, (b) en el número y disponibilidad de nutrientes y (c) en la temperatura. Es claro entonces que la combinación de todos estos factores influyen directamente en la diversidad biológica afectando el número de organismos presentes en un ecosistema, no importando si esta biodiversidad es *macro* o *microscópica*. En este sentido, los ecosistemas no son estáticos, por el contrario, evolucionan y cambian bajo condiciones determinadas. Por más de cuatro mil millones de años de evolución, las bacterias han sido testigos de un inmenso espectro de fuentes de energía y de condiciones ambientales, adaptándose adecuadamente a ellas lo que les hace uno de los más antiguos habitantes del planeta (Hunter-Cevera, 1998).

Si tomamos en consideración que el 75 % de nuestro planeta está cubierto por agua y que cerca del 70% de ella lo constituye el agua de los océanos, no es raro pensar que a la fecha existen una enorme cantidad de microorganismos desconocidos por el hombre y aún por descubrir. Apoyando lo anterior, un estimado empleando herramientas moleculares sugiere que la biodiversidad alcanza los 3.6×10^{29} células microbianas/mL en los océanos (Sogin *et al.*, 2006). Los microorganismos constituyen el pilar de la biosfera pues cuentan con la capacidad metabólica única de llevar a cabo los ciclos biogeoquímicos que son básicos para el sostén y desarrollo de la vida misma (Hunter-Cevera, 1998; Madigan *et al.*, 2004).

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

En este sentido, el aislar especies microbianas metabólicamente adaptadas al ambiente marino (*autóctonas*) realza la importancia actual del estudio de la microbiología marina y molecular, así como la diversidad microbiana de dicho ecosistema (Mincer *et al.*, 2002, Maldonado *et al.*, 2005a).

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

Las bacterias marinas son organismos unicelulares, microscópicos (menores a 2 μm de diámetro). De acuerdo a su clasificación nutricional se dividen en autótrofos y heterótrofos. Aquellos que obtienen su fuente de carbono a través de compuestos inorgánicos y orgánicos respectivamente. Con relación a la fuente de energía encontramos a los fototrofos, quienes obtienen su fuente de energía a través de la Luz, y a los quimiótrofos que

obtienen su energía a partir de la oxidación de compuestos inorgánicos. Las bacterias heterótrofas, saprófitas y parásitas obtienen energía de otros compuestos orgánicos. Las bacterias aeróbicas heterótrofas se encuentran generalmente en la columna de agua (cuerpo de agua uniforme) ya sea flotando o adjuntas a partículas, en la capa superior de los sedimentos del suelo marino y/o en los tejidos de plantas o animales. Las bacterias anaeróbicas habitan en profundidades mayores, es decir, capas de sedimentos anóxicos caracterizados por una pobre circulación o aquellas regiones muy contaminadas (Kennish, 2001).

Las bacterias epibióticas colonizan la superficie de los sustratos marinos que sirven como recurso alimenticio para protozoarios y otros heterótrofos y un gran número de bacterias vive en los sedimentos del suelo marino. Estos sedimentos contienen cantidades limitadas de materia orgánica, con la mayoría de las fuentes de carbono presentes en forma compleja tales como la quitina y/o la celulosa lo que posiblemente funciona como una fuente de carbono y nitrógeno para los microorganismos ahí presentes (Moat *et al.*, 2002; Magarvey *et al.*, 2004; Ward & Bora, 2006).

La abundancia de las bacterias va disminuyendo desde la costa (1 a 3×10^6 células por mililitro [cel/mL]) hasta la zona nerítica (10^4 a 10^6 cel/mL; Madigan *et al.*, 2004). Este comportamiento es similar en los fondos marinos, con la más alta cuenta bacteriana 10^{11} cel/mL observada en las precipitaciones lodosas de los estuarios (parte más ancha y profunda en la desembocadura de los ríos, mares abiertos o en los océanos) y cuentas menores en los sedimentos marinos profundos. La cuenta celular bacteriana así como la abundancia bacteriana también disminuye con el incremento de la profundidad dentro de los primeros 20 cm de la columna de sedimento. El mayor número de bacterias en la interfase sedimento-agua en los primeros 2 cm de los depósitos del fondo marino y declina progresivamente conforme aumenta la profundidad aunque cabe mencionar que son estimados

moleculares con base en un modelo bacteriano específico y no necesariamente representa a los microorganismos que puedan desarrollarse en condiciones de laboratorio (Stach *et al.*, 2003a). Sin embargo, existe una correlación entre lo mencionado anteriormente y la concentración de materia orgánica presente en la columna de agua y en el fondo de los sedimentos enriquecidos en materia orgánica o en concentraciones altas de carbón orgánico. Esto se debe a que las bacterias encuentran la mayor cantidad de nutrientes y las mejores condiciones de crecimiento en estos medios o ambientes (Kennish, 2001).

Debido a las características particulares de los océanos tales como salinidad (33% - 37%), pH (7.1 - 8.3), temperatura, accesibilidad, obtención de muestra y profundidad por mencionar algunas, en la mayoría de los casos no siempre es posible recrear las condiciones del medio natural que permiten la mejor recuperación o aislamiento adecuado de microorganismos, creando con ello dificultades para monitorear la diversidad microbiana en los diferentes hábitats acuáticos. Por esta razón, debe de considerarse que las técnicas tradicionales de muestreo y subsecuente cultivo deben ser constantemente actualizadas para así proporcionar nueva información con respecto a la diversidad de los microorganismos que existen en muestras ambientales del planeta (Magarvey *et al.*, 2004; Mincer *et al.*, 2002; Maldonado *et al.*, 2005b; Sogin *et al.*, 2006; Gontang *et al.*, 2007; Maldonado *et al.*, 2009).

1.2 La clase *Actinobacteria*

La clase *Actinobacteria* es un grupo heterogéneo de bacterias Gram positivas con un elevado contenido de Guanina y Citosina [G+C] y que suelen presentar una amplia variedad morfológica macro y microscópicamente (Logan, 1994).

En esta clase, predomina la forma de bacilos con desarrollo filamentososo debido a la presencia de hifas aéreas pero también pueden presentar morfología microscópica cocobacilar o difteroide ya que en algunos géneros de actinobacterias los filamentos se segmentan con gran facilidad durante el crecimiento dando origen a células pleomórficas (Staley *et al.*, 2007). Macroscópicamente algunos miembros presentan morfología colonial similar a las típicas colonias bacterianas pero con consistencia particularmente dura o rugosa (Figura 1).

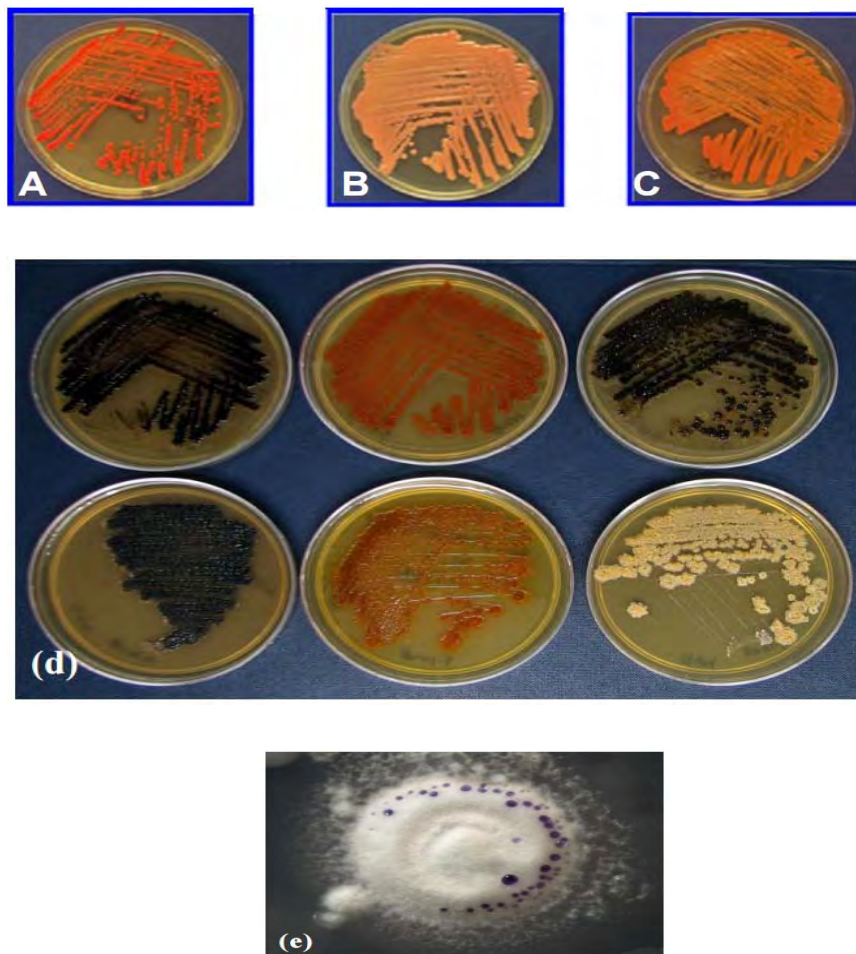


Figura 1. Diferentes morfologías macroscópicas de colonias de *Actinobacteria*. (a), (b) y (c), géneros *Dietzia* y *Gordonia*; (d) *Micromonospora* y (e) *Streptomyces*. Maldonado, sin publicar

En un principio a este grupo de microorganismos se les clasificó como hongos pero los estudios de los componentes de su pared celular así como estudios moleculares basados en secuencias del gen 16S ribosomal permitieron su reclasificación (Figura 2). Desde mediados de los años 50 se les suele referir con el nombre genérico de *Actinomicetos* ya que pertenecen al orden *Actinomycetales* el cual se encuentra dentro de la clase *Actinobacteria* (Stackebrandt *et al.*, 1997).

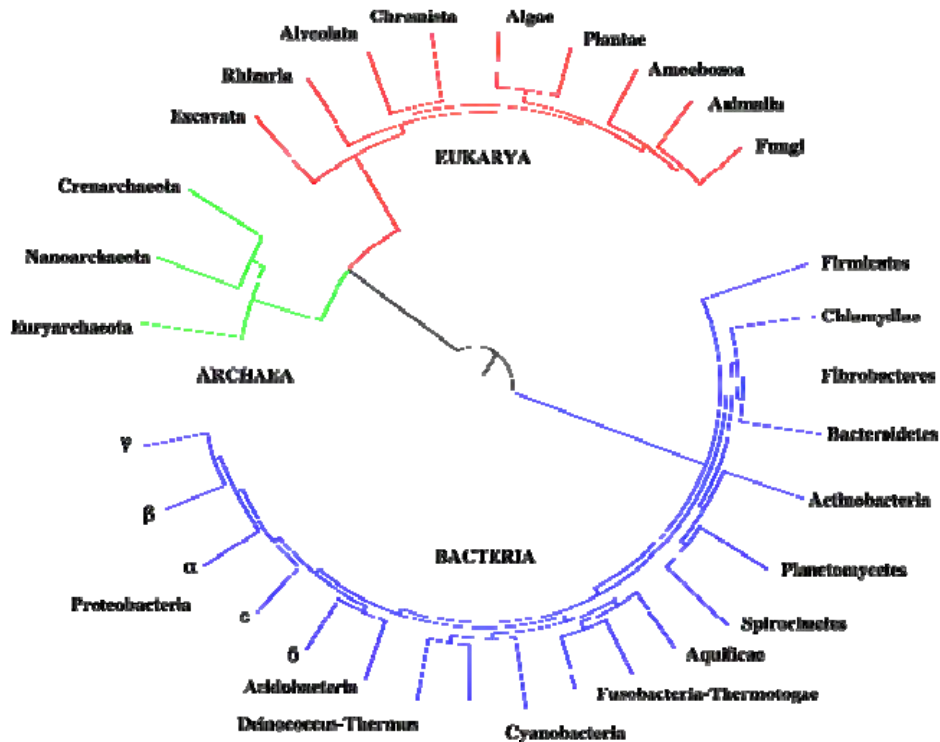


Figura 2. Árbol filogenético que muestra la posición de la clase *Actinobacteria* dentro de las Bacterias^a

En años recientes, un gran número de nuevas especies y/o géneros de la clase *Actinobacteria* han sido aislados de ecosistemas marinos por lo

que este ambiente es definitivamente una fuente rica de estos microorganismos (Magarvey *et al.*, 2004; Mincer *et al.*, 2002; Maldonado *et al.*, 2005b; Sogin *et al.*, 2006; Maldonado *et al.*, 2009). Los géneros *Salinispora* (Maldonado *et al.*, 2005a), *Solwaraspora* (Magarvey *et al.*, 2004), *Marinispora* (Kwon *et al.*, 2006) y *Lamerjespora* (Fortman *et al.*, 2005) son solo ejemplos de lo que está presente exclusivamente en muestras de sedimentos marinos.

1.3 El género *Micromonospora*

El género *Micromonospora* Orskov 1923 es Gram positivo, quimio-organotrofo, aerobio, y como el resto de la clase *Actinobacteria* se caracteriza por tener un alto contenido de G + C en su genoma (Hirsch *et al.*, 2009). Entre las características distintivas de este género se encuentra la ausencia de micelio aéreo, la producción de hifas septadas y la formación de esporas individuales (Figura 3). Conforme la colonia va madurando, las especies forman colonias indistintas con variaciones en la coloración, que va desde el amarillo al café o bien de naranja a rojo pero que termina usualmente en colonias de color negro lo que evidentemente dificulta cualquier posible caracterización macroscópica colonial (Figura 4).

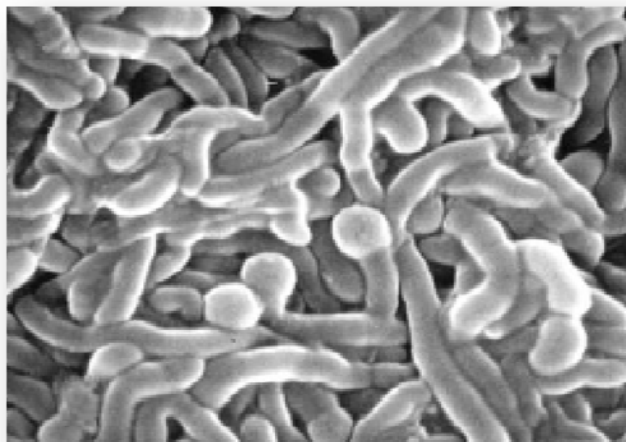


Figura 3. Morfología microscópica. *Micromonospora fulvividis* mostrando esporas individuales. (microscopía electrónica; Kroppenstedt *et al.*, 2005).

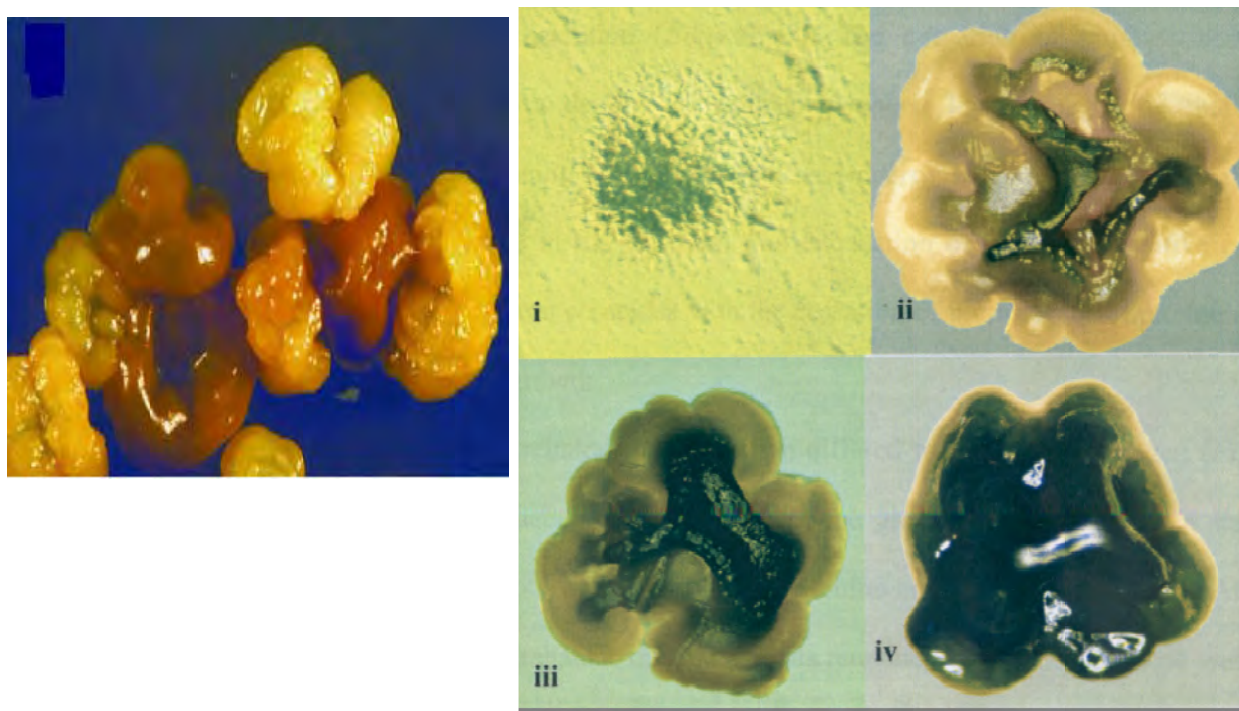


Figura 4. Izquierda; Morfología macroscópica colonias de *Micromonospora* L5 mostrando diferentes tonalidades (Hirsch *et al.*, 2009). Derecha; crecimiento-maduración de una colonia de *M. echinospora* (Hoskisson, 2002).

Es conocido que gran parte del interés en el estudio de la clase *Actinobacteria* lo constituye su innata producción de metabolitos secundarios y el género *Micromonospora* no es la excepción. El género es una fuente de varios metabolitos bioactivos, tales como antibióticos, especialmente aminoglucósidos y oligosacáridos, siendo algunos ejemplos *M. inyoensis* y *M. peuceticus* productores de Sisomicina y Adriamicina, respectivamente (Kroppenstedt, 2005). Otras moléculas activas sintetizadas por especies de *Micromonospora* son la vitamina B12 (Hirsch *et al.*, 2009) y compuestos antifúngicos (Ismet *et al.*, 2004). La especie *M. echinospora* es el productor de gentamicina, un antibiótico de uso común en medicina para el tratamiento de infecciones sistémicas graves provocadas por microorganismos susceptibles, especialmente gram negativos. Algunos ejemplos de las infecciones para las que está indicado este antibiótico son de las vías respiratorias, septicemias, infecciones de la piel, huesos o tejidos blandos, peritonitis, infecciones graves del sistema nervioso central (meningitis), infecciones gastrointestinales y quemaduras (PLM, 2010).

1.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR fue diseñada por Kary Mullis en 1983 aunque su primera publicación fue hasta el año de 1985. La técnica tiene su base en la actividad de la enzima DNA polimerasa, que cuenta con la capacidad de sintetizar una nueva cadena de DNA complementaria a partir de otra ya existente. Los requisitos de la enzima para llevar a cabo esta reacción son que existan nucleótidos en el medio (la materia base para fabricar la cadena complementaria de DNA) y una pequeña cadena de DNA que pueda unirse a la molécula que se requiera copiar para que sirva como cebadora o “*primer*”. La técnica emplea mínimas cantidades de DNA (menor a 1 µg) y consta

básicamente de 3 pasos fundamentales divididos en varios ciclos (usualmente de 25 hasta 40) que comprende:

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

En una PCR el primer paso consiste en la *desnaturalización* del DNA 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 conocidos como *iniciadores*, *oligonucleótidos* o *primers*) de modo que una polimerasa resistente a la desnaturalización por calor y usualmente la *Taq* polimerasa (aislada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*) extiende los extremos 3' de ambos oligonucleótidos empleando las hebras del DNA 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 (Figura 5).

Una segunda desnaturalización pone fin a un *ciclo* (los 3 pasos indicados previamente) y da comienzo al siguiente. De esta forma, al término del primer ciclo de reacción se obtienen dos copias idénticas bicatenarias del DNA original. Cada ciclo se repite alrededor de 25 a 40 veces, sin la adición de mas enzimas o reactivos 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 equivalente a 2^n , donde n representa el número de ciclos. Al término de todos los ciclos, la muestra se enfría a 4°C para su conservación y posterior análisis usualmente por electroforesis horizontal o submarina.

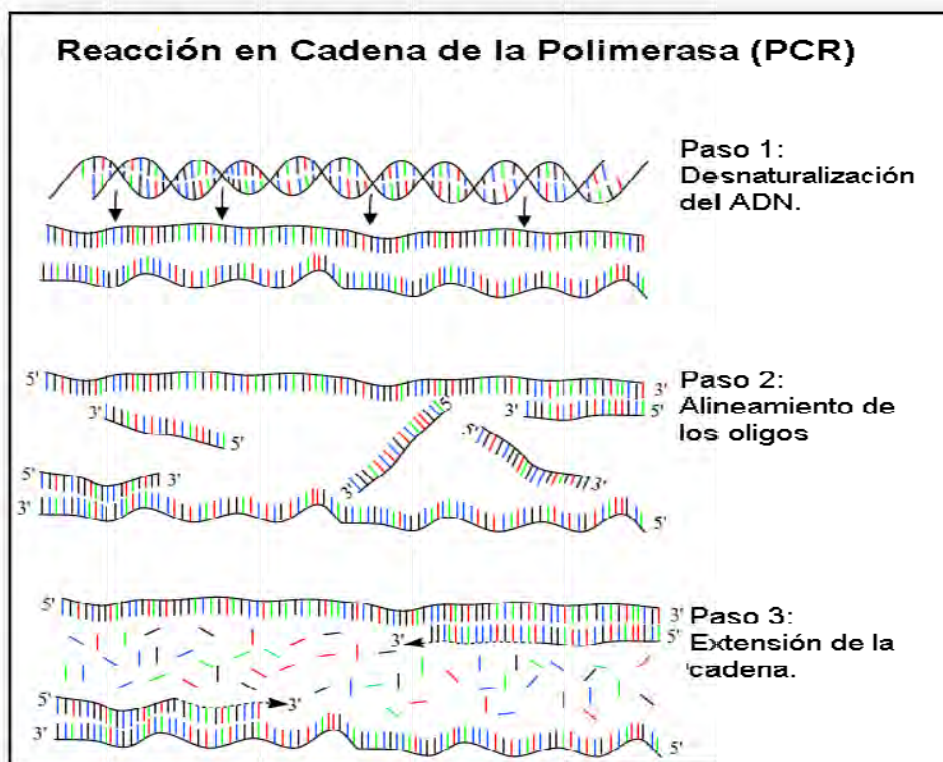


Figura 5. Representación esquemática de una PCR ^b

Para realizar la técnica de PCR se requieren los siguientes reactivos (Newton & Graham 1997).

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

- Iones Magnesio (Mg^{2+}), una concentración óptima de cloruro de magnesio ($MgCl_2$), es requerida para la actividad y fidelidad de la enzima DNA polimerasa.
- Búffer, mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la DNA polimerasa.
- DNA (*Taq*) polimerasa, actúa empleando el DNA molde para sintetizar la cadena complementaria.
- DNA 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.

1.5 Empleo de oligos específicos para la identificación bacteriana

1.5.1 Gen 16S rRNA

Ciertas macromoléculas se consideran cronómetros evolutivos (medidas del cambio evolutivo) debido a que nos permiten establecer las relaciones evolutivas entre diferentes microorganismos. Estas moléculas se deben escoger no sólo porque están universalmente distribuidas sino que deben además ser funcionalmente homólogas en cada organismo. Distintas evaluaciones empleando cronómetros moleculares han permitido identificar varios citocromos, proteínas de hierro y azufre tales como las ferredoxinas, y algunos genes como los RNAs ribósomicos siendo estos últimos los más ampliamente utilizados actualmente como las mejores herramientas para establecer dichas relaciones evolutivas (Madigan *et al.*, 2004).

El operón del RNA ribosomal se encuentra conformado de la siguiente manera (5'→3'): rRNA 16S, espacio de región, rRNA 13S, espacio de región y rRNA 5S tal como se indica en la Figura 6 (Maldonado, 2002).

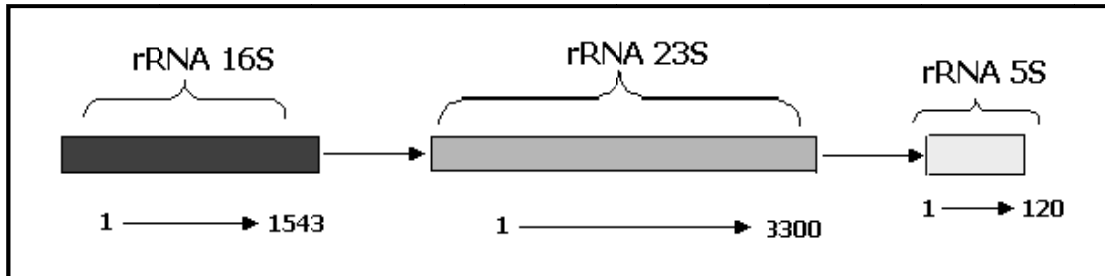


Figura 6. Distribución esquemática del operón del RNA ribosomal. Cada rectángulo indica los genes del operón. Las flechas indican la transcripción del operón, de izquierda a derecha, y los números representan el tamaño aproximado de cada gen o subunidad (Fragoso, 2009).

Para el estudio de bacterias y arqueas se recurre a la secuencia de la subunidad 16S rRNA porque reúne ciertas características favorables como: a) ser componentes cruciales de los ribosomas, b) poseer una función común en todas las células (elementos integrables del aparato de biosíntesis de proteínas) y c) su estructura primaria es un mosaico de secuencias conservadas y variables que permite el alineamiento de posiciones homólogas y la identificación de secuencias conservadas universalmente. De manera complementaria, hay poca evidencia de transferencia horizontal de genes de rRNA, así mismo, existen bases de datos muy completas de secuencias de rRNA de modo que se cuenta con bibliotecas para efectuar comparaciones o identificar nuevas secuencias.

La subunidad 16S presenta un tamaño adecuado, con 1 543 bases o nucleótidos y proporciona una buena resolución en el análisis filogenético sobre todo a nivel de género, en algunos casos hasta a nivel de especie. La subunidad 23S es considerada demasiado grande al contar con 3 300 bases

y la 5S demasiado pequeña pues solo cuenta con 120 nucleótidos y no proporciona ningún tipo de resolución filogenética (Head, 2004). Cabe hacer mención que aunque la secuencia del gen 16S rRNA es ampliamente utilizada, en algunas ocasiones la diferenciación entre dos grupos taxonómicos a nivel de especie no puede realizarse correctamente debido a lo altamente conservada que puede encontrarse esta secuencia entre organismos estrechamente relacionados. Cuando esta situación se presenta, es entonces necesario recurrir a secuencias de regiones de DNA que pueden ser menos conservadas que ésta (Zhang *et al.*, 2001). Estas secuencias pueden ser aquellas que corresponden a regiones espaciadoras o regiones intergénicas, e inclusive emplear algún otro cronómetro molecular.

Hablando específicamente de la clase *Actinobacteria* y a pesar de su comprobada utilidad, existen géneros en los que se ha reportado que la secuencia del gen del 16S no proporciona un buen nivel discriminatorio para el nivel de especies. Los géneros *Micromonospora* y *Tsukamurella* son un ejemplo claro de esta situación siendo además de particular interés el hecho de que el primero sea además un componente importante del hábitat marino. De acuerdo al trabajo realizado por Kasai y colegas en el 2000, la variación que existe en el gen 16S entre las especies de *Micromonospora* se encuentra en el rango del 99.0% lo que es un valor demasiado alto como para permitir discriminar entre especies. Es precisamente en el trabajo anterior donde los autores proponen como gen alternativo a la girasa-B, otro cronómetro molecular, a manera de emplearse como alternativa para la diferenciación de especies. Sin embargo, cuando se realizan estudios que impliquen involucrar un alto número de aislados o cepas, resulta clara la limitante económica de secuenciar varios genes y/o igual número de aislados por lo que técnicas moleculares que generen patrones únicos o huellas genómicas (*fingerprint patterns*) resultan una muy buena alternativa (Maldonado *et al.*, 2008).

Lo anterior sin embargo, no resulta una limitante para emplear el gen 16S como herramienta para el diseño de oligos específicos que permitan identificar aislados a nivel de género. De hecho en la actualidad numerosas identificaciones moleculares a nivel de género para *Actinobacteria* están basadas en el empleo de oligos dirigidos al gen del 16S (Moron *et al.*, 1999; Salazar *et al.*, 2000, 2002; Tan *et al.*, 2006).

En la actualidad, existen inclusive oligos considerados como *universales* que pueden amplificar cualquier clase u orden específico. Por ejemplo, el par de oligos F27 y R1492 es universal para el dominio *Bacteria*. Los oligos S-C-Act-235-a-S-20 y s-C-Act-878-a-A-19 son universales para la clase *Actinobacteria* con una especificidad del 82% hacia los géneros de esta clase (Stach *et al.*, 2003b). Bajando en el sistema jerárquico taxonómico, los oligos específicos para la familia *Micromonosporaceae* son el M2F y el A3R (Monciardini *et al.*, 2002) mientras que el par M558F y C1028R son género-específico para *Micromonospora* (Qiu *et al.*, 2008). Todos estos son algunos ejemplos de oligos que van dirigidos al gen 16S rRNA.

1.5.2 Aplicación de oligos para la identificación bacteriana

Para efectuar una amplificación por PCR se debe conocer la secuencia de nucleótidos del segmento al cual va dirigida la amplificación para diseñar o utilizar los oligos complementarios a la región de interés (al inicio y el termino del copiado). Así, un juego o par de oligos consiste en un forward y un reverso, uno que va en dirección 5' → 3' y otro que corresponde al sentido 3' → 5' respectivamente. El uso entonces de oligos dirigidos a regiones del rRNA que se conoce son específicas del organismo (especie) u organismos (género) de interés, facilitan una detección cualitativa y cuantitativa como lo constituye una variante conocida como "*PCR en Tiempo Real*".

La variabilidad intrínseca del gen del 16S permite el diseño de oligos a partir de regiones tanto conservadas como variables. La secuencia blanco puede tratarse de regiones de correlación filogenético entre grupos o familias, o una región variable para hacerlo más específico ya sea para diferenciar familias, géneros o especies, todo ello dependiendo del enfoque que se le quiera dar al trabajo de interés (Heuer *et al.*, 1997; Monciardini *et al.*, 2002; Stach *et al.*, 2003b).

1.6 Técnicas moleculares basadas en PCR

1.6.1 Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP).

El estudio del Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados es una técnica molecular que posee un alto poder discriminatorio y que se fundamenta en la amplificación, mediante PCR, de fragmentos de restricción (generados del ADN del organismo) a los que previamente se les ha unido unos adaptadores que son complementarios con oligos específicos. Las variaciones metodológicas de la técnica se mencionan adelante.

Existen diversos métodos basados en la PCR que son útiles para la generación de huellas genómicas o “*fingerprints*”. Una de estas técnicas ampliamente utilizada para la tipificación de bacterias, hongos y levaduras es el *rep*-PCR (Amplificación por PCR de elementos Palindrómicos Extragénicos Repetitivos) que incluso anteriormente se ha descrito para generar perfiles o patrones de banda en aislados de *Micromonospora* (Maldonado *et al.*, 2008). Sin embargo, muchas de estas técnicas no cuentan con un nivel adecuado de resolución y reproducibilidad en donde los resultados pueden variar de acuerdo a las condiciones utilizadas. En

contraste con esta desventaja, la técnica es rápida, poco laboriosa y económica.

El AFLP (por sus siglas en inglés *Amplified Fragment Length Polymorphism*) está basada en la amplificación selectiva de fragmentos de restricción de DNA genómico (Aruni *et al.*, 2000). Esta técnica es la más prometedora a la fecha pues cuenta con una alta reproducibilidad y discriminación en la obtención de “*fingerprints*”. La técnica ha sido empleada con éxito en animales y mapeo genético de plantas, diagnósticos médicos, tipificación bacteriana y estudios filogenéticos (Savelkoul *et al.*, 1999).

En términos generales, la técnica requiere una ligación de los adaptadores a los fragmentos de restricción seguida de una PCR basada en la amplificación con oligos específicos para los adaptadores (Figura 7). Para el análisis por AFLP se necesita una pequeña cantidad de DNA genómico purificado, el cual debe ser digerido con enzimas de restricción. Al incubar la muestra con endonucleasas se producen fragmentos de diferente tamaño a los que subsecuentemente se les adiciona o “*liga*” un adaptador cuya secuencia es complementaria a los primers por emplearse en PCR (Savelkoul *et al.*, 1999). Para AFLP generalmente se utilizan enzimas como *EcoRI*, *Asel*, *HindIII*, *Apal* y *PstI*.

Se han reportado dos variantes de la técnica, una de ellas utiliza dos enzimas de restricción para digerir el DNA genómico. La segunda variación de la técnica lleva a cabo la digestión utilizando únicamente una enzima de restricción (usualmente aquellas con una alta frecuencia de corte; Figura 8). Sin embargo se ha visto que para optimizar el método generalmente se utiliza la combinación de dos enzimas para la digestión, una con una baja frecuencia de corte (*EcoRI*, *Asel*, *HindIII*, *Apal* o *PstI*) que reconoce secuencias específicas de 6 a 8 bases y una segunda enzima con una alta frecuencia de corte (*Msel* o *TaqI*) que solo reconoce secuencias de 4 bases,

generándose un mayor número de fragmentos y aumentando la complejidad de los patrones de “fingerprint” resultantes (Montaño *et al.*, 2006).

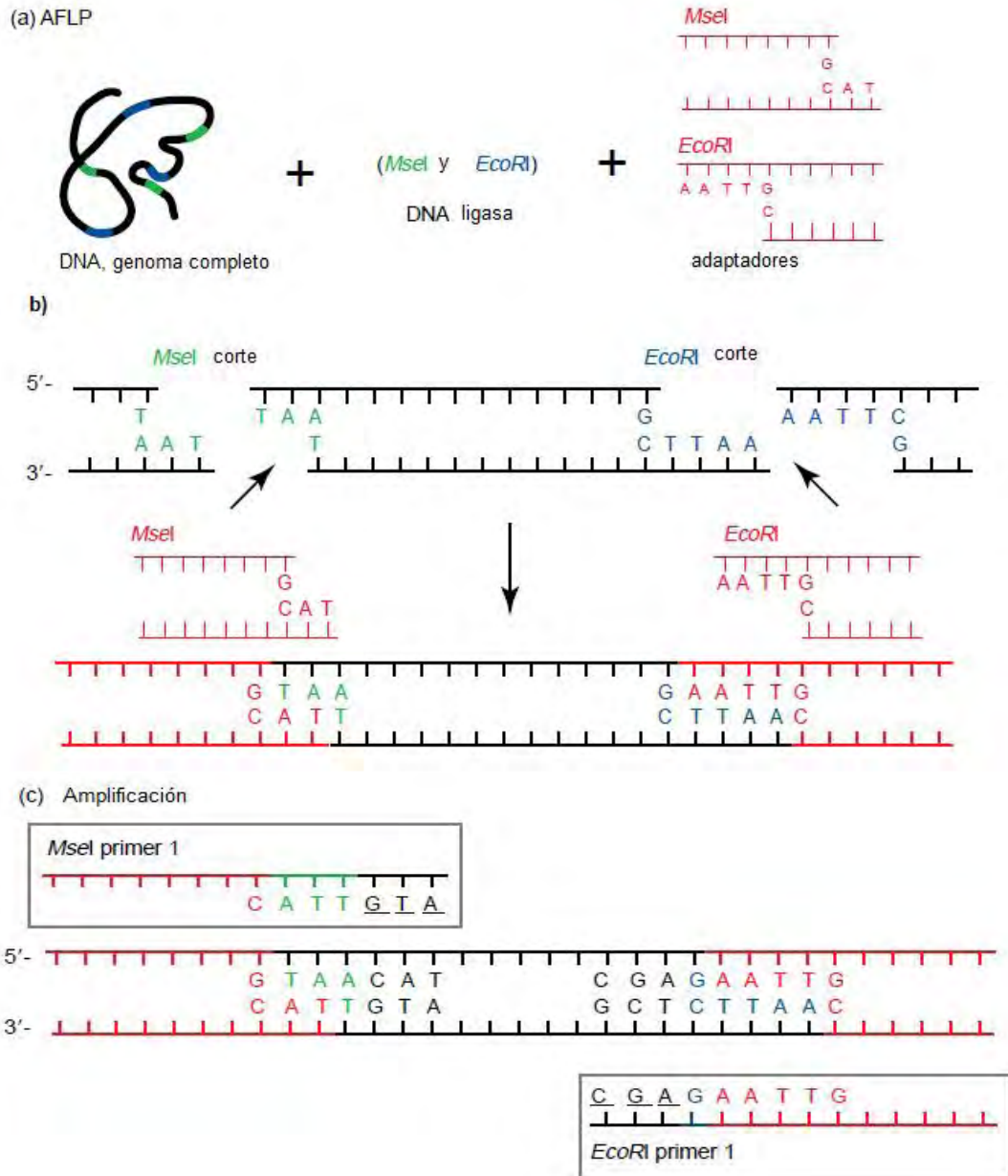


Figura 7. Esquematización de la técnica AFLP, empleando dos enzimas de restricción; a) incubación del ADN con las enzimas y los adaptadores b) Ligación de los adaptadores a los fragmentos de restricción c) Amplificación de los fragmentos (Mueller & Wolfenbarger, 1999; editada).

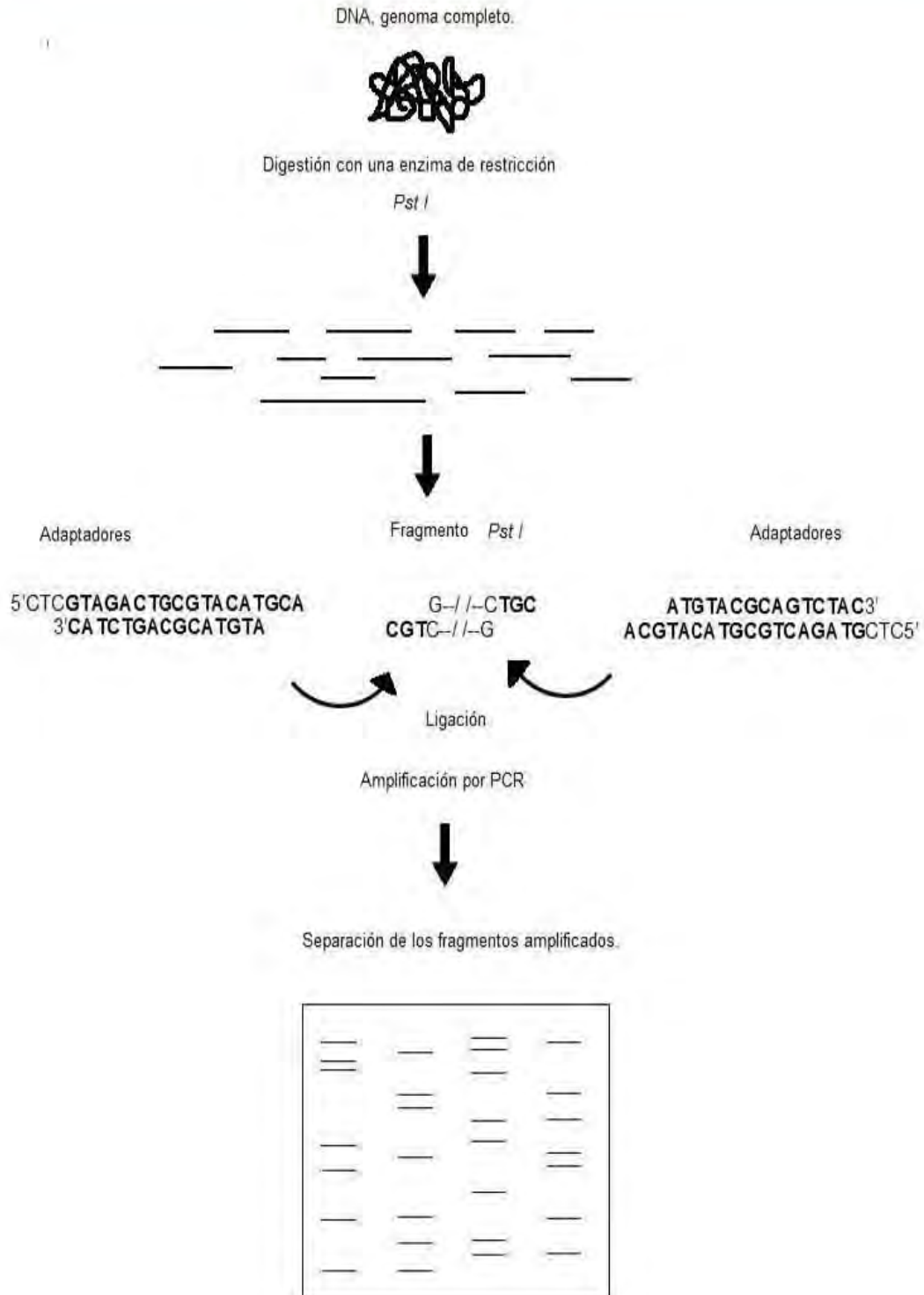


Figura 8. Esquemización de la técnica AFLP, empleando una enzimas de restricción; *Pst* I (Maldonado, 2002; editada).

Los adaptadores son oligonucleótidos de doble cadena, con extremos pegajosos complementarios y son diseñados de tal manera que el sitio de restricción inicial no sea restaurado después de la ligación. Lo anterior permite realizar la restricción y ligación de manera simultánea. Una vez realizado el paso de “restricción-ligación”, entonces la muestra es sometida a amplificaciones por PCR bajo condiciones altamente estrictas con oligos específicos para los adaptadores, que poseen en su sitio terminal 3' una extensión de uno a tres nucleótidos dentro del fragmento de restricción cromosomal desconocido (Savelkoul *et al.*, 1999).

El resultado de los fragmentos se pueden visualizar al realizar una electroforesis en gel de agarosa tiñiendo con bromuro de etidio o alternativamente, con el uso de oligos marcados con fluorescencia pues permite su uso en secuenciadores automáticos. Los patrones obtenidos de diferentes cepas son polimórficos debido a (i) mutaciones en los sitios de restricción, (ii) mutaciones en las secuencias adyacentes en los sitios de restricción pero complementarias a la extensión del primer seleccionado, y (iii) inserciones o deleciones del sitio de restricción o dentro del fragmento amplificado.

Un factor de gran importancia en el procedimiento de AFLP es la elección de la enzima o el par de enzimas de restricción que sean las más adecuadas. Valsangiacomo *et al.* (1995) sugirió que la selección de la endonucleasa de restricción debería ser basada en el contenido de G+C y en el tamaño del genoma del organismo blanco. Janssen y colegas (1996) probaron varios pares de enzimas y sugieren que *EcoRI* o *MseI* deben ser usadas en los análisis con bajo contenido de G+C en el genoma. Ellos consideraron a *HindIII* como la enzima más adecuada para la digestión de ADN genómico con un contenido del 40 al 50% mol de G+C. Una digestión con *MseI* fue insignificante para DNA bacteriano con alto contenido de G+C (más del 65% mol), moderadamente para DNA con un contenido entre 50 y

65% mol de G+C, y óptimo para DNA con un contenido de G+C debajo del 50% mol. Por otro lado reportan que se apreció una alta frecuencia de la escisión con *TaqI* para todas las muestras de DNA sin importar el contenido de G+C. Los autores recomiendan el uso de set de enzimas y oligos estandarizados independientemente del tipo de organismo e indican que la prueba es suficientemente flexible para usar cuatro enzimas de restricción que resultaran en un número de fragmentos con tamaño adecuado, sin considerar el contenido de G+C en el DNA.

A continuación se mencionan algunas de las ventajas que la técnica AFLP posee:

- Uso de oligos específicos que proporcionan resultados confiables y reproducibles.
- Muchos subconjuntos de restricción que pueden ser amplificados por el cambio en la extensión del nucleótido en la secuencia del primer.
- Se obtienen resultados de alta resolución debido al uso de condiciones estrictas de PCR.
- No requiere conocimiento previo de alguna secuencia genómica.

Sin embargo el método también posee algunas desventajas que se enlistan en seguida:

- La elección adecuada de las enzimas para la restricción de los fragmentos.
- La técnica se lleva a cabo en 2 días lo que presenta un inconveniente si queremos resultados rápidos.
- La interpretación de resultados puede llegar a ser difícil.
- Es una técnica laboriosa.

AFLP implica indagar el genoma completo en lugar de solo una región como en el análisis por RFLP o amplificación por PCR de los rRNA

(Vanechoutte, 1996; Jensen *et al.*, 1993). En contraste la técnica de AFLP no muestra variación alguna en la eficiencia de la amplificación debido a cambios pequeños en la temperatura lo que si ocurre con técnicas como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) o REP (Meunier & Grimont, 1993; Penner *et al.*, 1993) lo que hace una buena alternativa para generar patrones específicos moleculares.

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El género *Micromonospora* se caracteriza por la producción de una sola hifa bien desarrollada y ramificada en el sustrato. Las esporas (no móviles), son cortas con un diámetro de 0.25-0.6 μm (Hirsch *et al.*, 2009) y se producen de manera individual. Las colonias son generalmente anaranjadas que progresivamente pasan de marrones a negras, terminando con un aspecto mucoso de tonalidad oscura que es indicativo del proceso de esporulación. Debido a que muchos de los aislados del género *Micromonospora* no son fácilmente distinguibles por lo descrito anteriormente con base en su morfología y debido a que el tipo de colonias que forman pueden ser confundidas con otros géneros como *Salinispora* y *Verrucosipora* (también de la familia *Micromonosporaceae*), en el presente trabajo de investigación se evaluaron métodos moleculares que primero permitan identificar aislados a nivel de género empleando oligos específicos y después discriminar entre los aislados de estudio empleando la técnica de AFLP con una enzima de restricción.

3 OBJETIVOS

General

Evaluar una herramienta de Biología Molecular que proporcione información específica y confiable para la adecuada discriminación de especies del género *Micromonospora* y que pudiese ser aplicada a muestras ambientales.

Particulares

- Evaluar oligos específicos para la detección del género *Micromonospora* a través de amplificación por PCR.
- Caracterizar molecularmente a los aislados de estudio mediante la técnica de AFLP utilizando 3 diferentes oligos y determinar si existe variabilidad genética entre los aislados.

4 HIPÓTESIS

La técnica AFLP proporcionará resultados reproducibles y confiables en la identificación de especies del género *Micromonospora*.

5 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

El diseño experimental para el presente proyecto está esquematizado en términos generales en el siguiente diagrama de flujo:

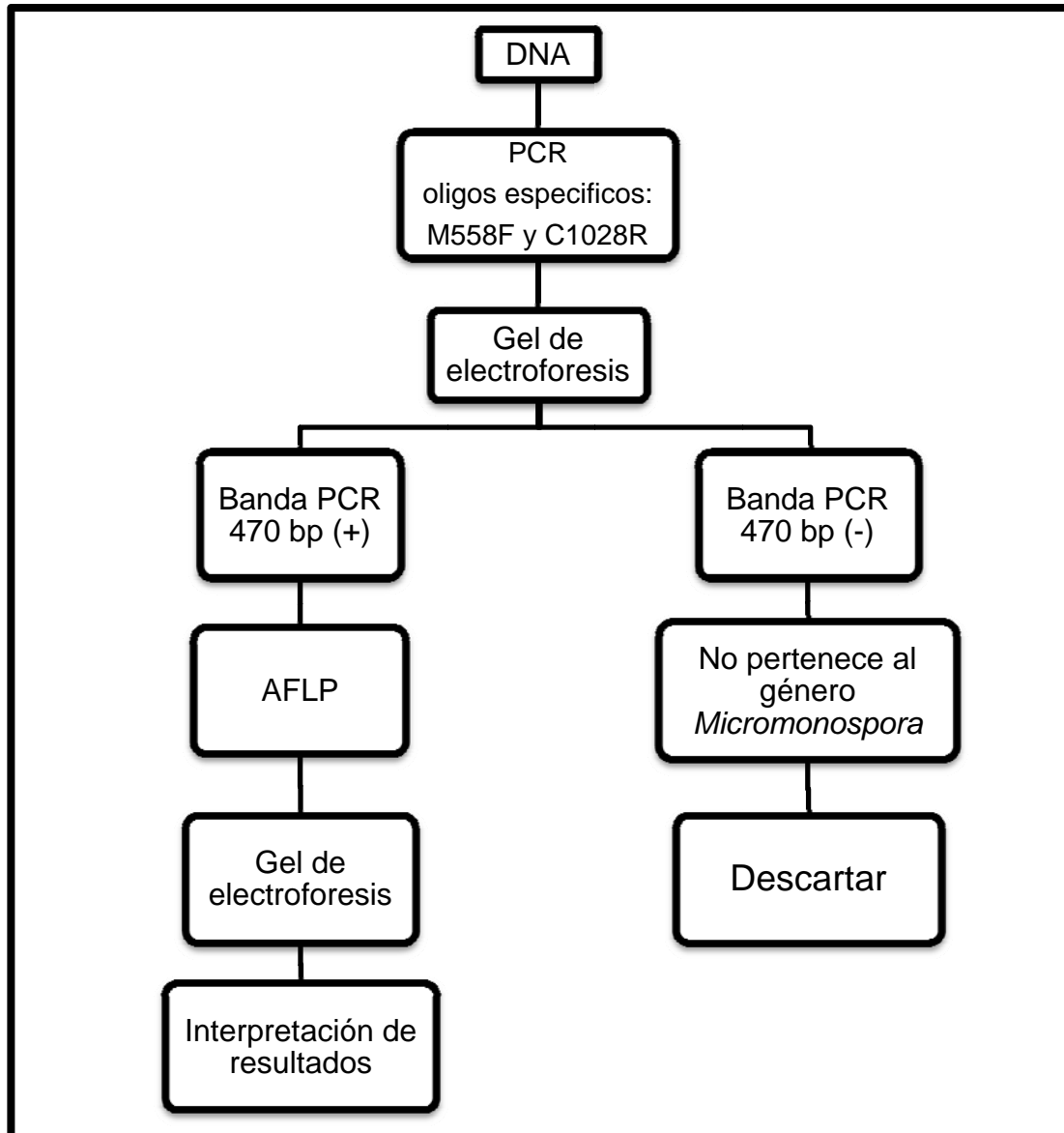


Figura 9. Diseño experimental del proyecto de investigación.

5.1 Materiales y métodos

5.2 Origen de las muestras y DNA

Las muestras de estudio habían sido previamente caracterizadas mediante técnicas macro y microscópicas de acuerdo al trabajo de Gutiérrez y colaboradores (2006). Los 33 aislados incluidos en este trabajo provenían de muestras de sedimentos marinos del Golfo de California que fueron recolectados durante la campaña oceanográfica de Febrero del 2006. El material genético empleado había sido extraído de los aislados de interés desde el trabajo de Fragoso (2009) y conservado en un congelador a -20°C hasta su utilización. Dichos aislados no fueron incluidos en el trabajo mencionado (Fragoso 2009) por haberseles “identificado” como *Micromonospora*.

5.3 PCR para caracterizar a nivel de género

Para la amplificación del DNA a través de la PCR se emplearon los oligos específicos:

- M558F (5'-CGGCTTGTCGCGTCGACT-3')
- C1028R (5'-ATGCACCACCTGTGACCGC-3')

Mediante el siguiente protocolo:

1.- A un tubo Eppendorf se agregaron 2 μL buffer 10X NH_4 (pH 8.8, Bioline, EUA), 0.6 μL MgCl_2 (50mM, Bioline, EUA), 0.5 μL dNTP's (100 mM; Bioline EUA), 0.2 μL oligo M558F (20 μM , Sigma EUA), 0.2 μL oligo C1028R (20 μM , Sigma EUA), 0.06 μL *Taq* Pol (5 u/ μL ; Bioline EUA), 0.4 μL DNA y agua para PCR necesario para llevar a un volumen final de 20 μL .

En el control negativo se sustituyó la misma cantidad de DNA por agua para PCR.

2.- Cada tubo se colocó en el Termociclador MULTIGENE II Labnet durante 35 ciclos bajo las siguientes condiciones: 94°C por un minuto, 60°C por un minuto, 72°C por un minuto y una extensión final (72°C) por diez minutos. El producto de PCR de cada muestra se examinó por medio de una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1 %.

5.3.1 Electroforesis horizontal, agarosa al 1%

Los productos amplificados fueron separados a través de electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1%. A continuación se detalla el procedimiento realizado:

- 1.- A un matraz Erlenmeyer se adicionó 1g de agarosa al cual se le agregaron 100 mL de Búffer TBE 0.5X (Tris Borato EDTA), que se calentó en un horno de microondas hasta su completa disolución.
- 2.- Un vez disuelto se agregó 1 µL de Bromuro de Etidio agitándose suavemente para homogenizar la mezcla.
- 3.- Se decantó la mezcla en una charola de plástico para electroforesis a la cual previamente se habían colocado los peines que tienen como finalidad formar los pozos en el gel (Figura 10).
- 4.- El gel se dejó secar a temperatura ambiente dentro de una campana de extracción hasta su completa gelificación (aproximadamente 30-45 minutos).
- 5.- La cámara para electroforesis se llenó con búffer TBE 0.5X y se sumergió el gel retirando los peines, permitiendo así que los pozos se llenaran con el búffer indicado.

6.- Para cargar el gel con las muestras se mezclaron 4 μL del producto de PCR con 4 μL de buffer de carga, homogenizando y aplicando esta mezcla en cada uno de los pozos correspondientes en el gel de agarosa. Al principio y al final de las muestras (pozos en los extremos del gel) se agregaron 0.5 μL de marcador de peso molecular (Bioline, EUA).

7.- Posteriormente se colocó la tapa de la cámara y se conectaron los electrodos, dejando correr durante 1 hora con una diferencia de potencial de 75 Volts.

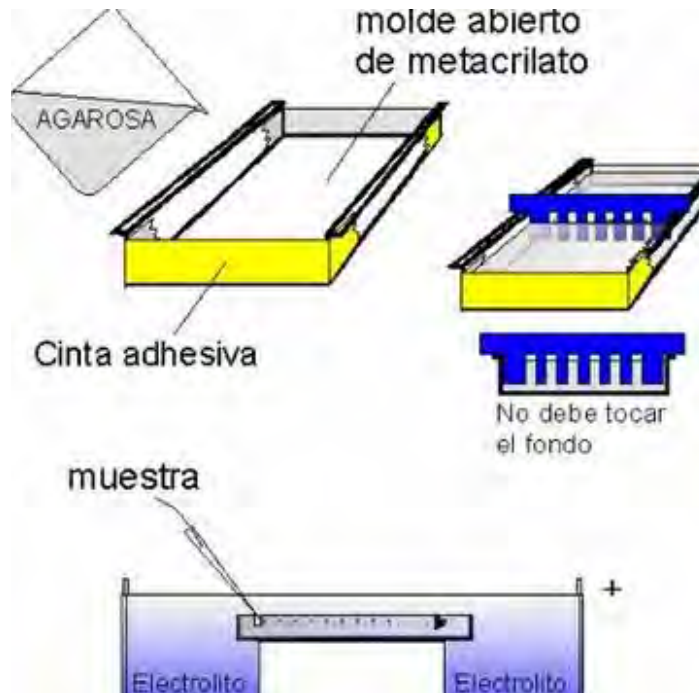


Figura10. Ejemplo que representa el vertido del gel de agarosa en la cámara de electroforesis horizontal y la colocación de la muestra en los pozos ^c

8.- Una vez transcurrido el tiempo se transfirió el gel a un transiluminador (Ultra Violet Products, EUA) para visualizar las bandas obtenidas y por medio de un fotodocumentador (Probiotek, México) la imagen se guardó en una memoria para posteriormente transferirla a una computadora e imprimirla.

Los resultados considerados como positivos son aquellos en los que se obtiene una banda de 470 pares de bases (bp; Qiu *et al.*, 2008) de manera contraria se consideran negativos.

5.4 AFLP

5.4.1 Reacción de digestión y ligación de adaptadores

Se utilizó la endonucleasa *Pst*I como enzima de restricción cuya secuencia de corte se ilustra en la figura 11 así como los siguientes adaptadores:

- LG1 (5'-CTCGTAGACTGCGTACATGCA-3')
- LG2 (5'-ATGTACGCAGTCTAC-3')

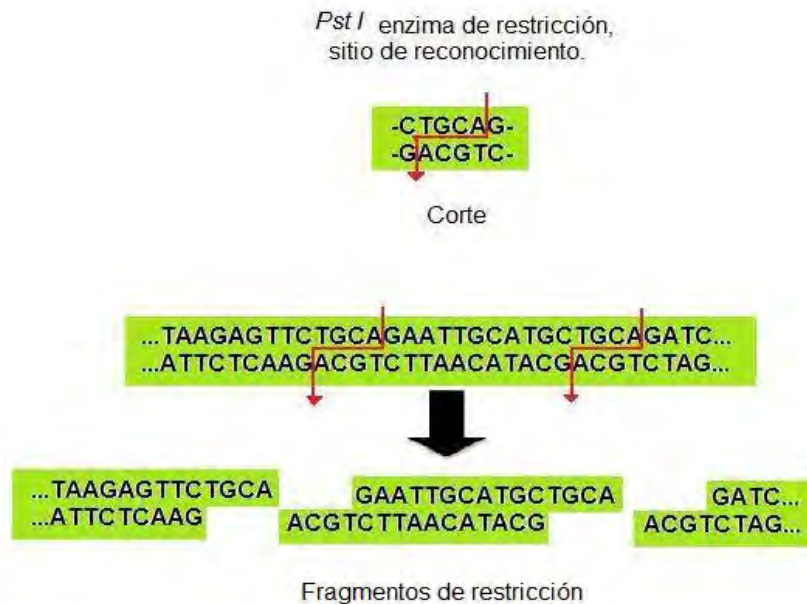


Figura 11. Indica los sitios de reconocimiento y de corte para la enzima *Pst*I.

El procedimiento tuvo los siguientes pasos:

1.- A un tubo Eppendorf de 1.5 mL se adicionaron 2 μL de enzima de restricción *Pst*I (10 u/ μL , Fermentas Canada), 2 μL búffer T4 10X (pH 7.8, Fermentas Canada), 0.2 μL Ligasa T4 (5 u/ μL , Fermentas Canada), 0.5 μL adaptador LG1 (20 μM ; Genset EUA), 0.5 μL adaptador LG2 (20 μM ; Genset EUA), 5 μL DNA y la cantidad de agua necesaria para llevar a un volumen final de 20 μL .

2.- Los tubos se incubaron en un baño seco (Daigger EUA) a 37 °C por un mínimo de 12 horas. Terminado el tiempo (12-16 horas) los tubos se retiraron y se emplearon como templado para la siguiente PCR.

5.4.2 PCR AFLP

Para la amplificación del DNA a través de la PCR se utilizaron los siguientes oligos específicos:

- AF-1 (5'-GACTGCGTACATGCAGC-3')
- AF-2 (5'-GACTGCGTACATGCAGG-3')
- AF-3 (5'-GACTGCGTACATGCAGA-3')

El procedimiento realizado fue el siguiente:

1.- A cada tubo Eppendorf se agregó 2.5 μL buffer 10X NH_4 (pH 8.8, Bioline EUA), 0.55 μL MgCl_2 (50mM, Bioline EUA), 0.6 μL dNTP's (100 mM, Bioline EUA), 1 μL oligo AF-1 (20 μM Genset EUA), 1 μL oligo AF2 (20 μM Genset EUA), 1 μL oligo AF3 (20 μM Genset EUA) -según fuera la reacción por realizar-, 0.1 μL *Taq* Pol (5 u/ μL , Bioline EUA), 1 μL DNA proveniente de la reacción anterior y agua para PCR necesaria para llevar a un volumen de 20 μL .

En el control negativo se sustituyó la misma cantidad de DNA por agua para PCR.

2.- Cada tubo se colocó en un Termociclador marca Eppendorf modelo Mastercycler epgradient (Eppendorf, Alemania) bajo las siguientes condiciones: un ciclo de 10 minutos a 95°C, dos ciclos de: 95°C por 45 segundos, 60°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos, dos ciclos de: 95°C por 45 segundos, 59°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos, dos ciclos de 95°C por 45 segundos, 58°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos y así sucesivamente, bajando la temperatura un 1 °C cada dos ciclos hasta llegar a 50°C para mantenerla por trece ciclos y una extensión final de 72°C por 10 minutos.

El producto de PCR de cada muestra se examinó por medio de una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5 %.

5.4.3 Electroforesis horizontal, agarosa al 1.5%

1.- A un matraz Erlenmeyer se adicionaron 3 g de agarosa al cual se le agregaron 200 mL de Búffer TBE 0.5X (Tris Borato EDTA, Sigma EUA). La mezcla se calentó en un horno de microondas hasta alcanzar su completa disolución.

2.- Una vez disuelto se agregaron 2 µL de Bromuro de Etidio se agitó suavemente para homogenizar la mezcla.

3.- La mezcla se decantó en una charola de plástico para electroforesis a la cual previamente se le colocaron los peines como se indico previamente.

4.- El gel se dejó secar a temperatura ambiente dentro de una campana de extracción hasta su completa gelificación.

5.- La cámara para electroforesis se llenó con búffer TBE 0.5X y se sumergió el gel retirando los peines, permitiendo así que los pozos se llenaran con el búffer.

6.- Para cargar el gel con las muestras se mezclaron 8 μ L del producto de PCR con 2 μ L de búffer de carga, homogenizando y aplicando esta mezcla en cada uno de los pozos correspondientes en el gel de agarosa. Agregando 0.5 μ L de marcador de peso molecular (Bioline, EUA) al principio y al final de las muestras.

7.- Posteriormente se colocó la tapa de la cámara y se conectaron los electrodos, dejando correr durante 3 horas con una diferencia de potencial de 70 Volts.

8.- Una vez transcurrido el tiempo el gel se transfirió a un transiluminador (Ultra Violet Products, EUA) para visualizar las bandas obtenidas y por medio de un fotodocumentador (Probiotek, México) la imagen se guardó en una memoria CompactFlash (Lexar, EUA).

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Identificación específica del género

Se analizaron treinta y tres diferentes aislados procedentes de ambientes marinos a los cuales se les asignaron diferentes códigos para su identificación (tabla 1).

Algunos de los aislados dieron un resultado negativo para la identificación molecular con oligos género-específicos. Esto es interesante pues los aislados habían sido previamente “*identificados*” como *Micromonospora* en un trabajo anterior con base en sus características macro y microscópicas (Tabla 1; Gutiérrez *et al.*, 2006). Los oligos M558F y C1028R utilizados en esta amplificación generan fragmentos de aproximadamente 470 pb (pares de bases, Figura 12). Aquellas muestras donde hubo amplificación y presencia del producto esperado se le consideró como positiva.

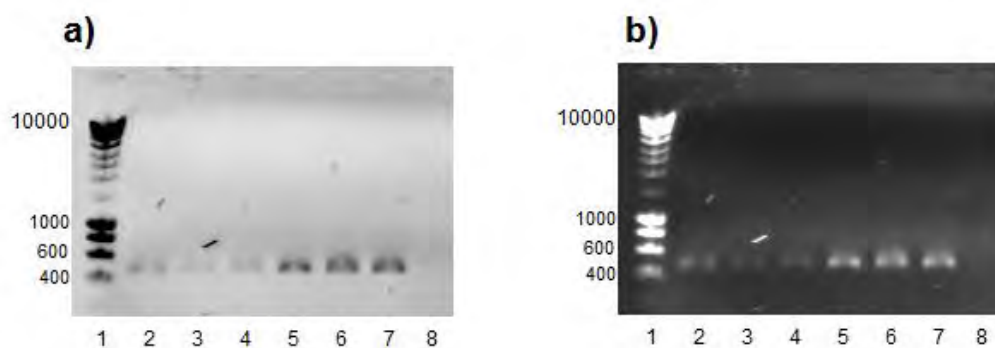


Figura 12. Imagen ilustrativa del producto de PCR obtenidos para la identificación del género *Micromonospora*. (1) marcador de peso molecular, (2) RD001, (3) RD002, (4) RD003, (5) RD004, (6) RD006, (7) control positivo, (8) control negativo. (a) imagen negativo, (b) imagen normal.

Tabla 1. Resultados obtenidos mediante la amplificación por PCR con oligos género-específicos de diferentes aislados de *Micromonospora* provenientes de ambientes marinos.

código del microorganismo	PCR oligos específicos M558F C1028R	código del microorganismo	PCR oligos específicos M558F C1028R
RD 001	+	RD 031	+
RD 002	+	RD 032	+
RD 003	+	RD 033	+
RD 004	+	RD 035	+
RD 005	-	RD 041	+
RD 006	+	RD 043	+
RD 007	+	RD 044	+
RD 008	+	RD 046	+
RD 010	+	RD 048	+
RD 011	+	RD 049	+
RD 013	-	RD 050	+
RD 014	+	RD 053	+
RD 016	+	RD 054	+
RD 018	+	RD 055	+
RD 022	-	RD 056	+
RD 024	+	RD 057	+
RD 027	+		

Se indica en la Figura 13 el porcentaje de aislados y la proporción de aislados que fueron positivos a la amplificación por el par de oligos específicos M558F y C1028R.

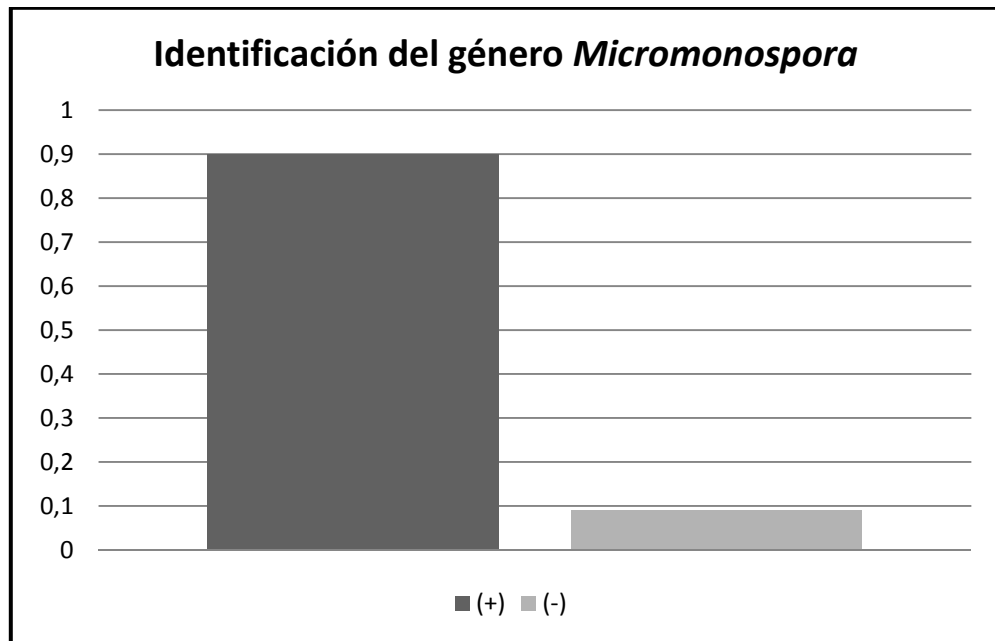


Figura 13. La gráfica ejemplifica que un porcentaje elevado de aislados fueron clasificados como miembros del género de estudio; (+) representa aquellas cepas que revelaron, a nivel molecular, pertenecer al género *Micromonospora*; (-) aquellas que no lo fueron.

6.2 Discriminación entre aislados de *Micromonospora*

Se prepararon reacciones de restricción-ligación para la técnica de AFLP para 30 de los 33 aislados que dieron positivos a la PCR previa. Una vez realizada la PCR para AFLP y el corrimiento de los geles correspondientes, se obtuvieron patrones de banda como se muestra en la Figura 14. Los patrones o *fingerprint* generados muestran múltiples bandas de amplificación que variaron desde 1 hasta 6 fragmentos con bandas de amplificación cuyos tamaños oscilan entre los 400 y los 1000 pb.

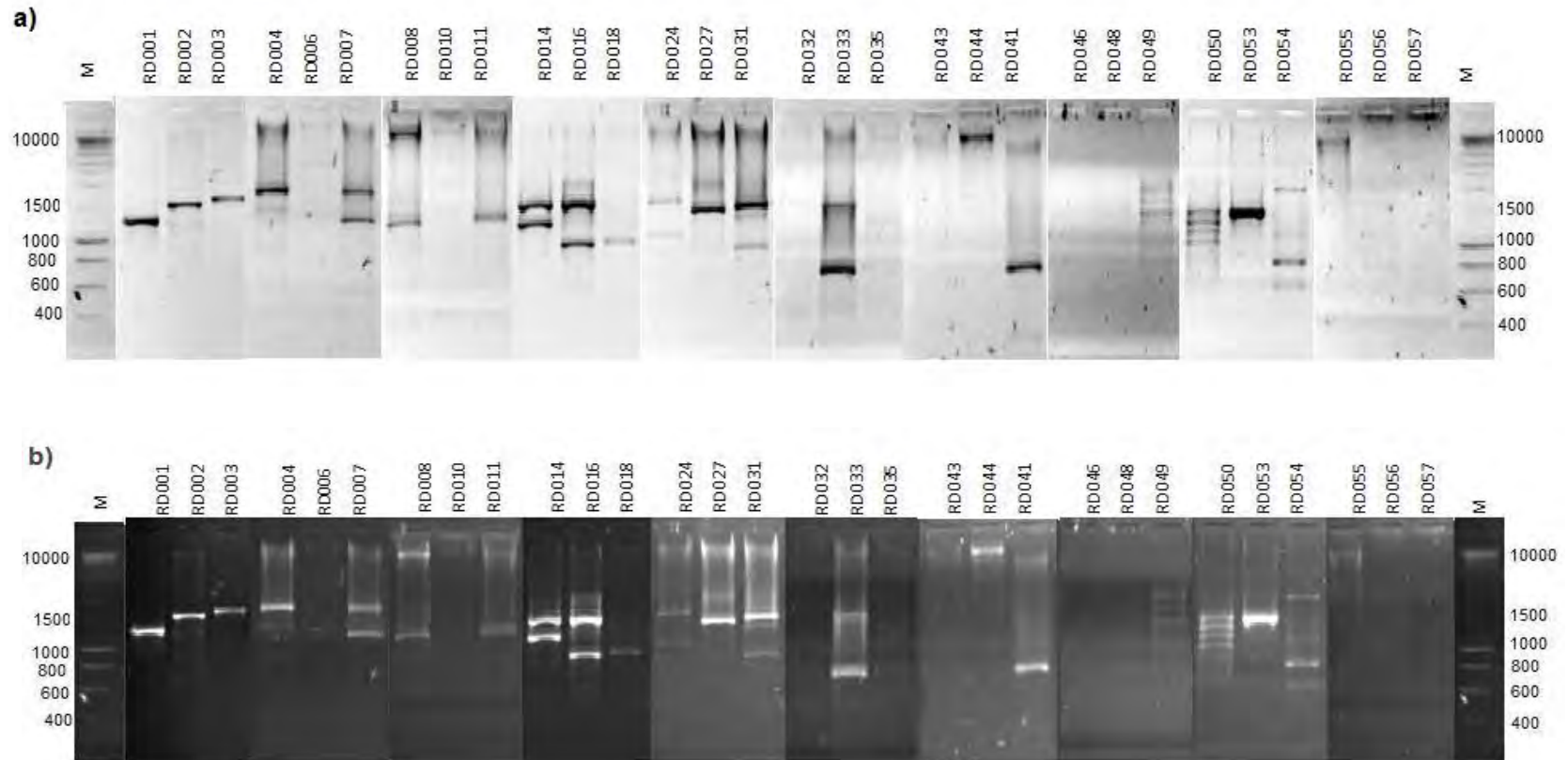


Figura 14. Diferentes huellas genómicas generadas a través de la técnica AFLP en un gel de agarosa al 1.5%, utilizando la enzima *Pst*I para la digestión del ADN, (M) Marcador de peso molecular; utilizando AF1 como oligo específico para los adaptadores LG1 y LG2; (a) imagen negativa; (b) imagen normal.

Es notorio mencionar que en términos generales, se obtuvieron una gran variedad de perfiles aunque algunos de los DNAs empleados no generaron ningún tipo de *fingerprint* como ocurrió para las cepas RD043, RD046, RD048, RD056 y RD057 con el oligo AF1; RD003, RD011, RD041, RD056 para el oligo AF2; y RD031, RD032, RD033, RD034, RD043, RD041, RD056, RD057 al emplear el oligo AF3.

Lo anterior resulta muy particular debido a que esos mismos DNAs ya habían dado un resultado positivo en la amplificación al emplear oligos específicos M558F-C1028R para el género *Micromonospora* pero es consistente con resultados previos que indican la dificultad para trabajar con el material genético de *Micromonospora* (Maldonado *et al.*, 2008).

En la Tabla 2 se indican aquellos aislados cuyos patrones son sumamente parecidos de acuerdo al oligo que se hubiera empleado.

Tabla 2. Resultados que mostraron patrones idénticos de los diferentes aislados de *Micromonospora*.

Oligo	Patrones idénticos.
AF1	ninguno
AF2	RD014 con RD018
AF3	RD001 con RD003 RD048 con RD049 RD053 con RD054

6.2.1 Oligo AF1

De acuerdo con las imágenes obtenidas al emplear el oligo AF1 (Figura 14), podemos observar que se generaron 25 patrones distintos para los 30 aislados, sin embargo no se obtuvieron patrones para las cepas RD 043, RD046, RD 048, RD 056 y RD 057.

Debe resaltarse que los *fingerprints* que se obtuvieron con éste oligo no mostraron similitud alguna lo que permite asumir que existe una alta diversidad de *Micromonospora*; lo que si podemos afirmar es que existen bandas en común para algunas cepas como es el caso de la banda cuyo tamaño aproximado es de 1000 pb que se encuentra presente tanto en la cepa RD 016 como en la RD 018 y en la RD 031.

Existe otra banda cuyo tamaño aproximado es de 1 250 pb presente únicamente en RD 001 y RD 007; también es el caso de la banda de 750 pb en RD 033 y RD 041ó aquella banda de 1 400 pb común para RD 049, 050 y 053 y aquella banda que se presentó en un mayor número de cepas fue la de 1 500 pb (RD 002, 014, 016, 027, 031 y 033).

También cabe mencionar que cada oligo generó diferentes perfiles para cada aislado así como diferentes niveles de selectividad encontrándose el AF1 aquel que presentó un nivel intermedio.

6.2.2 Oligo AF2

La figura 16 muestra los resultados obtenidos en la amplificación con el oligo AF2, en la que podemos observar que se generaron 25 patrones distintos para los aislados analizados, como en el caso anterior aquí también se presentan cepas que no generaron perfiles como es el caso de RD 003, 011, 041 y 056.

Con respecto a los patrones para aquellas cepas donde si se obtuvo un *fingerprint*, debe resaltarse que existen algunas similitudes por ejemplo el aislado RD 014 con el RD 018.

De acuerdo a lo observado por los patrones generados podemos corroborar que existe una alta diversidad de *Micromonospora*, y que el oligo empleado en este caso fue el menos selectivo de los tres.

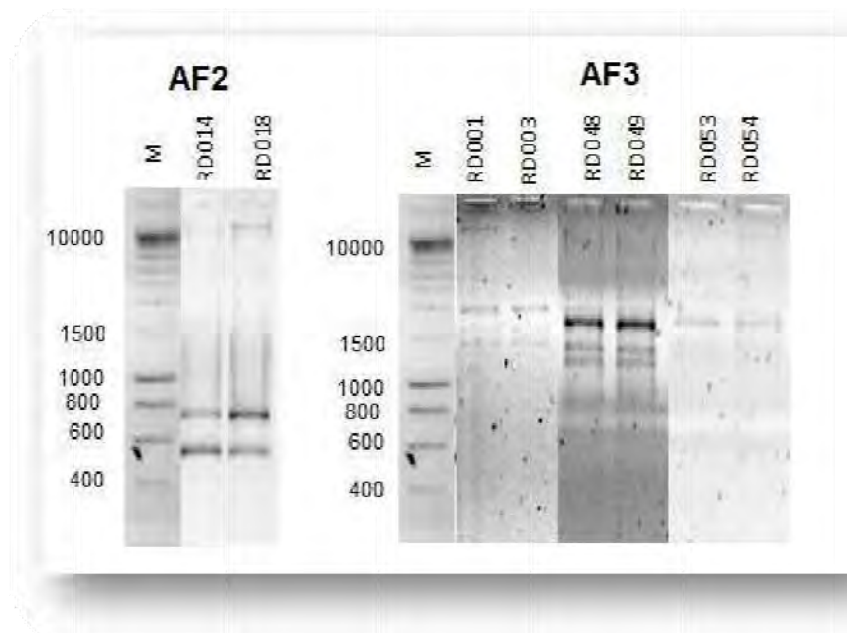


Figura 15. Muestra los perfiles idénticos que se presentaron en la amplificación con el oligo AF2 y AF3.

Las bandas que se presentan en común para diversos aislados son de los siguientes tamaños aproximados 450 pb (RD 024 y RD 048), 600 pb (RD 014, 016 y 018), 780 pb (RD 001, 004, 007 y 048), 800 pb (RD 004, 007, 014, 016 y 018), 1 200 pb (RD 006 y 043), 1 400 pb (RD 001 y 055), 1 500 pb (RD 002, 004, y 033), más de 10 000 pb (RD 044 y RD 016).

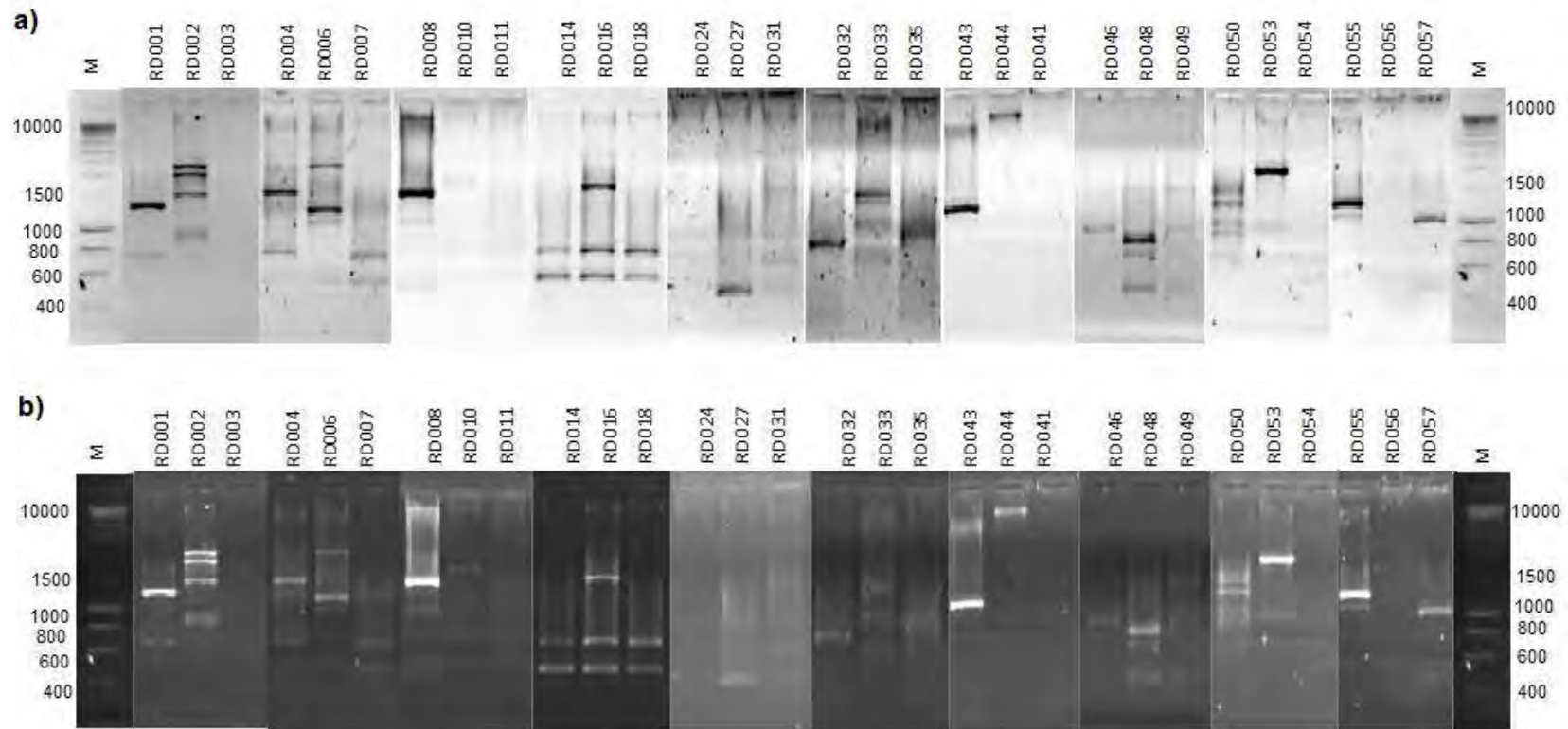


Figura 16. Muestra las diferentes huellas genómicas generadas a través de la técnica AFLP. (M) Marcador de peso molecular; utilizando AF2 como oligo específico para los adaptadores LG1 y LG2; (a) imagen negativa; (b) imagen normal.

6.2.3 OligoAF3

Los resultados que se presentan en la figura 17 son aquellos obtenidos en la amplificación con el tercer oligo AF3. En donde se muestra que se generaron 19 patrones distintos para los aislados analizados, en este caso se presenta un mayor número de muestras en las que hay ausencia total de bandas como es el caso de las siguientes cepas RD 031, RD 032, RD 033, RD 035, RD 043, RD 041, RD 056 y RD 057 es por ello que se piensa que este primer es el más selectivo de los tres evaluados.

Al emplear este oligo se obtuvieron un mayor número de cepas con perfiles muy parecidos como son RD 001 con RD 003, RD 048 con RD 049, y RD 053 con RD 054.

También podemos observar la presencia de ciertas bandas que se encuentran de manera frecuente en algunas cepas, por ejemplo, RD 018 presenta una banda de 1 000 pb que también está presente en RD 050, en la muestra RD 001, 002 y 003 podemos localizar una banda de un tamaño aproximado de 2 000 pb y en las cepas RD 004, 006 y 007 encontramos una banda de 1 500 pb

Cabe mencionar que los fragmentos amplificados presentan menos variabilidad y tamaño superior que en aquellos generados con los oligos AF1 y AF2.

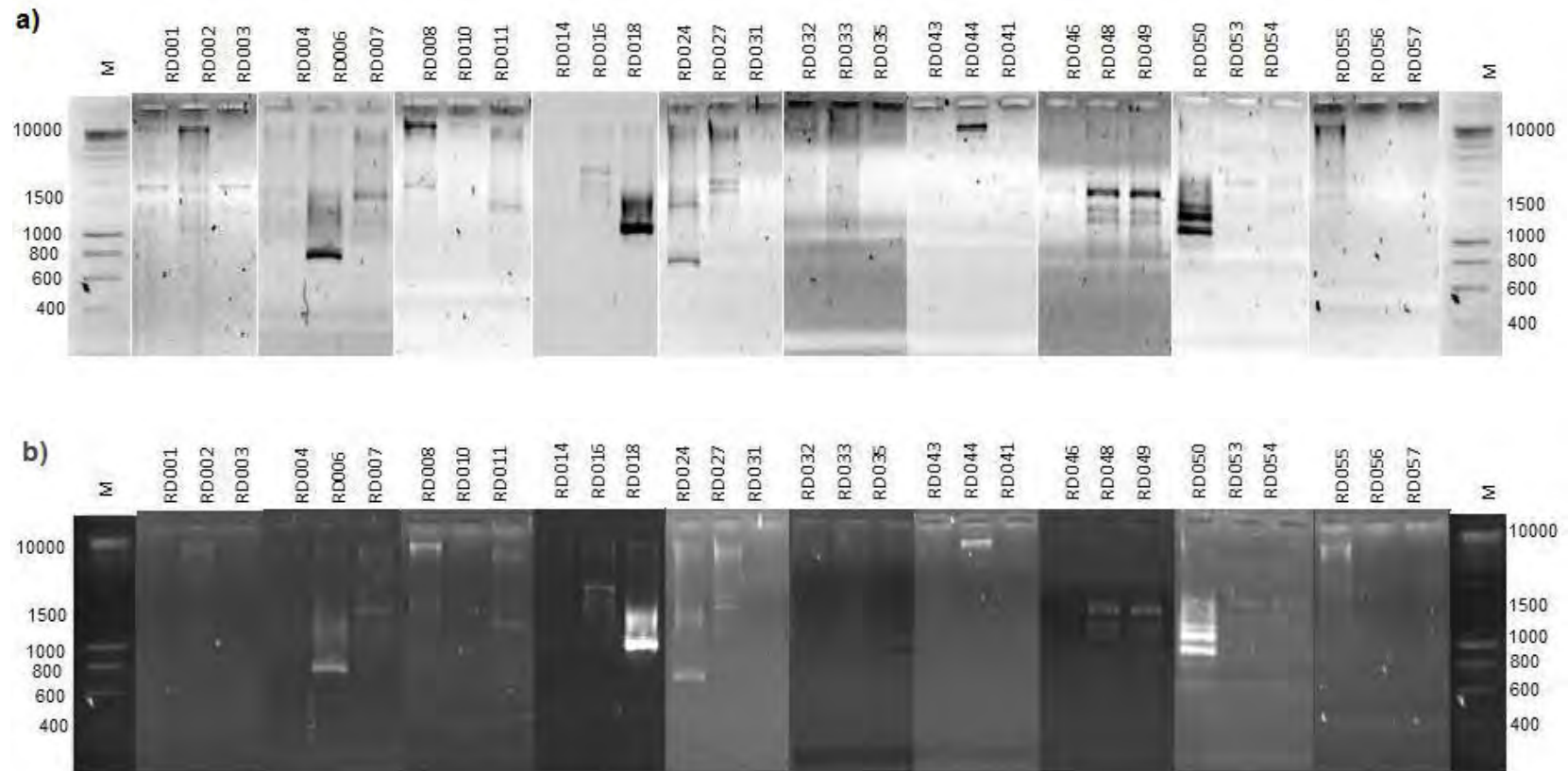


Figura 17. Muestra las diferentes huellas genómicas generadas a través de la técnica AFLP. (M) Marcador de peso molecular; AF3 oligo específico para los adaptadores LG1 y LG2. (a) imagen negativa; (b) imagen normal.

7 CONCLUSIONES

La técnica de PCR fue adecuada para establecer la identidad de aislados del género *Micromonospora* como tales, utilizando los primers M558F y C1028R y con ello obteniendo un 91% de los aislados analizados como resultados positivos. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Qiu *et al* (2008) en cuanto a la selectividad y eficacia de los oligos.

La técnica AFLP fue útil para genotipificar los aislados de estudio ayudándonos a diferenciar entre especies del género y se pudo aplicar con éxito para esta caracterización. Igualmente reveló que existen diferencias en la especificidad de los oligos, en este caso, aquel que nos proporcionó un mayor número de bandas el AF2.

La utilización de una enzima de restricción generó patrones adecuados y específicos de bandas en cada aislado analizado ayudándonos a diferenciar especies y a obtener, en algunos casos, perfiles de bandeo idénticos.

Considerando los resultados obtenidos durante la realización de este trabajo podemos afirmar que existe gran variabilidad biológica de *Micromonospora* en ambientes marinos.

Los ambientes marinos poseen una gran biodiversidad inexplorada, herramientas moleculares como el AFLP nos ayudarán a obtener resultados confiables en un menor tiempo considerando el análisis de un gran número de muestras conjuntamente.

8 PERSPECTIVAS

- ✓ Para asegurar la reproducibilidad de la técnica es necesario realizar el experimento bajo condiciones distintas, por ejemplo variando las condiciones de PCR al aumentar la concentración de $MgCl_2$ o al establecer una temperatura de alineamiento adecuada para los oligos.
- ✓ Es importante mencionar que para comprobar los resultados podemos secuenciar ciertos genes como son la girasa B o el gen 16S.
- ✓ Asimismo podemos realizar un árbol filogenético con la finalidad de comprobar las relaciones que existen entre las especies y determinar sus distancias evolutivas.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Aruni, Z. & Androulla, E. 2000. **Use of Amplified Fragment Length Polymorphisms for Typing *Corynebacterium diphtheriae*.** *Journal of Clinical Microbiology* 38: 3843-3845.
2. Fortman, J.L., Magarvey, N.A. & Sherman, D.H. 2005. **Something old, something new: ongoing studies of marine actinomycetes.** *Proceedings SIM*. Abstract S86.
3. Fragoso, D.M. 2009. **Caracterización fenotípica y genotípica de bacterias Gram(+) aisladas del pacífico mexicano.** Tesis de licenciatura, QFB, Facultad de Química, UNAM.
4. Gontang, E.A., Fenical, W. & Jensen, P. 2007. **Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria cultured from marine sediments.** *Applied and Environmental Microbiology* 71:3272-3282.
5. Gutiérrez, R., Olguín-Castellanos, J., Quintana, E.T. & Maldonado, L.A. 2006. **Exploitable actinobacterial diversity recovered from marine sediments collected in Mexico.** En, Proceedings of the Atlantic Ocean Biogeochemistry and Biodiversity Meeting. Julio 20, Londres, Inglaterra.
6. Head, I. M. 2004. **Recovery and Analysis of Ribosomal RNA Sequences from the Environment.** *Ecology Manual* 2° ed. Kluwer Academic Publisher, USA; 139-142.
7. Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K. & Wellington, E.M.H. 1997. **Analysis of actinomycete communities by specific amplification**

- of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients.** *Applied and Environmental Microbiology* 63:3233-3241.
8. Hirsch, A., & Valdés, M. 2009. ***Micromonospora*: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels.** *Soil Biology & Biochemistry* 42: 536-542.
9. Hoskisson, P.A. 2002. ***Micromonospora echinospora* (ATCC 15837) growth, differentiation and antibiotic production.** Tesis doctoral, Universidad Liverpool John Moores. Liverpool, Reino Unido.
10. Hunter-Cevera J. C. 1998. **The value of microbial diversity.** *Current Opinion in Microbiology.* 1:278-285.
11. Ismet, A., Vikinesawary, S., Paramaswari, S., Wong, W.H., Ward, A., Seki, T., Fiedler, H. P., Goodfellow, M. 2004. **Production and chemical characterization of antifungal metabolites from *Micromonospora* sp. M39 isolated from mangrove rhizosphere soil.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20:523e528.
12. Janssen, P., Coopman, R., Huys, G., Swings, J., Bleeker, M., Vos, P., Zabeau, M., Kertters, K. 1996. **Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy.** *Microbiology* 142: 1881-1993.
13. Jensen, M., Webster, J. & Straus, N. 1993. **Rapid Identification of Bacteria on the Basis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Ribosomal DNA Spacer Polymorphisms.** *Applied and Environmental Microbiology.* 59: 945-952.

14. Kennish, J.M. 2001. **Practical Handbook of Marine Sciences**. CRC Press. New Jersey, USA. 441-444 pp.
15. Kroppenstedt, R.M., Mayilraj, S., Wink, J., Kallow, W., Schumann, P., Secondini, Ch. & Stackebrandt, E. 2005. **Eight new species of the genus *Micromonospora*, *Micromonospora citrea* sp. nov., *Micromonospora echinaurantiaca* sp. nov., *Micromonospora echinofusca* sp. nov., *Micromonospora fulviviridis* sp. nov., *Micromonospora inyonensis* sp. nov., *Micromonospora peucetia* sp. nov., *Micromonospora sagamiensis* sp. nov., and *Micromonospora viridifaciens* sp. nov.** *Systematic and Applied Microbiology* 28:328-329.
16. Kwon, H.C., Kauffman, C.A., Jensen, P.R. & Fenical, W. 2006. **Marinomycins A-D, antitumor antibiotics of new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus "*Marinispora*".** *Journal of the American Chemical Society* 128:1622-1632.
17. Logan, N. 1994. **Bacterial systematics**. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
18. Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. 2004. Brock. **Biología de los microorganismos**, 10° ed. Pearson Prentice Hall, España ; 302-305, 307-308, 312-314.
19. Magarvey, N.A., Keller, J.M., Brennan, V., Dworkin, M. & Sherman, D.H. 2004. **Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites.** *Applied and Environmental Microbiology* 70: 7520-7529.

20. Maldonado L. A. 2002. **Polyphasic taxonomy of members of the genus *Nocardia***. Tesis doctoral, Universidad de Newcastle. Newcastle Upon Tyne, Inglaterra Reino Unido.
21. Maldonado, L. A., Fenical, W., Jensen, P.R., Kauffman, C. A., Mincer, T.J., Ward, A. C., Bull, A: T. & Goodfellow, M. 2005a. ***Salinispora arenicola* gen. nov., sp. Nov. and *Salinispora tropica* sp. Nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae***. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:1759-1766.
22. Maldonado, L.A., Fragoso-Yáñez, D., Pérez-García, A., Rosellón-Druker, J. & Quintana, E.T. 2009. **Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico**. *Antonie van Leeuwenhoek* 95:111-120.
23. Maldonado, L.A., Stach, J.E.M., Pathom-aree, W., Ward, A.C., Bull, A.T. & Goodfellow, M. 2005b. **Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments**. *Antonie van Leeuwenhoek* 87: 11-18.
24. Maldonado, L.A., Stach, J.E.M., Ward, A.C., Bull, A.T. & Goodfellow, M. 2008. **Characterisation of micromonosporae from aquatic environments using molecular taxonomic methods**. *Antonie van Leeuwenhoek* 94:289-298.
25. Meunier, J., & Grimont, P. 1993. **Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting**. *Research in Microbiology* 144: 373-379.

26. Mincer, T. J., Jensen, P.R., Kauffman, C.A. & Fenical, W. 2002. **Widespread and persistent population of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments.** *Applied and Environmental Microbiology* 61: 5005-5011.
27. Moat, A.G., Foster, J.W. & Spector, M.P. (Eds). 2002. **Microbial Physiology.** Fourth Edition. Wiley-Liss, John Wiley & Sons, Inc.
28. Monciardini, P., Sosio, M., Caletti, L., Chiocchini, C. & Donadio, S. 2002. **New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes.** *FEMS Microbiology and Ecology* 42:419-429.
29. Moron, R., Gonzalez, I. & Genilloud, O. 1999. **New genus-specific primers for the PCR identification of members of the genera *Pseudonocardia* and *Saccharopolyspora*.** *International Journal of Systematic Bacteriology* 49:149-162.
30. Montaña, K., Villalpando, E., Vargas, F. 2006. **AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) y su aplicación en acuicultura.** *Interciencia* 31:563-569
31. Mueller, U. & Wolfenbarger, L. 1999. **AFLP genotyping and fingerprinting.** *Tree* 14: 389-394
32. Newton CR, Graham A 1997. **PCR.** 2nd edn, pp. 75–84. *BIOS Scientific Publishers, Oxford.*
33. Penner, G., Bush, A., Wise, R., Kim, W., Domier, L., Kasha, K., Laroche, A, Scoles, G., Molnar, S. & Fedak, G. 1993. **Reproducibility**

- of random amplified polymorphic DNA. *PCR Methods and Applications* 2, 341-345.
34. PLM. 2010. **Diccionario de Especialidades Farmacéuticas**. Edición 56, Tomo I, Pág. 1840.
35. Qiu, D., Ruan, J. & Huang, Y. 2008. **Selective isolation and rapid identification of members of the genus *Micromonospora***. *Applied and Environmental Microbiology* 74:5593-5597.
36. Salazar, O., Gonzalez, I. & Genilloud, O. 2002. **New genus-specific primers for the PCR identification of new isolates of the genera *Nocardiopsis* and *Saccharothrix***. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52:1411-1421.
37. Salazar, O., Moron, R. & Genilloud, O. 2000. **New genus-specific primers for the PCR identification of members of the genus *Saccharomonospora* and evaluation of the microbial diversity of wild-type isolates of *Saccharomonospora* detected from soil DNAs**. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 2043-2055.
38. Savelkoul, P., Aarts, H., Dijkshoorn, L., Duim, B., Otsen, M., Rademaker, J., Schouls, L. & Lenstra, J. 1999. **Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis: the State of an Art**. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 3083-3091.
39. Sogin M. L., Morrison H. G., Huber J. A., Welch D. M., Huse S. M., Neal P. R., Arrieta J.M. & Herndl G. J. 2006. **Microbial diversity in the deep sea and the underexplorer “rare biosphere”**.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 32: 12115-12120.

40. Stach, J.E.M., Maldonado, L.A., Masson, D.G., Ward, A.C., Goodfellow, M. & Bull, A.T. 2003a. **Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments.** *Applied and Environmental Microbiology* 69:6189-6200.
41. Stach, J.E.M., Maldonado, L.A., Ward, A.C., Goodfellow, M. & Bull, A.T. 2003b. **New primers for the class *Actinobacteria*: application to marine and terrestrial environments.** *Environmental Microbiology* 5:828-841.
42. Stackebrandt, E., Rainey, F.A. & Ward-Rainey, N.L. 1997. **Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria classis nov.*** *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 479-491.
43. Staley, J.T., Gunsalus, R.P., Lory, S. & Perry, J.J. (eds). 2007. **Microbial life.** *Sinauer Associates Inc.*
44. Tan, G.Y.A., Ward, A.C. & Goodfellow, M. 2006. **Exploration of *Amycolatopsis* diversity in soil-using genus-specific primers and novel selective media.** *Systematic and Applied Microbiology* 29:557-569.
45. Valsangiacomo, C., Baggi, F., Gaia, V., Balmelli, T., Peduzzi, R. & Piffaretti, J. 1995. **Use of amplified length polymorphism in molecular typing of *Legionella pneumophila* and application to epidemiological studies.** *Journal of Clinical Microbiology* 33: 1716-1719.

46. Vaneechoutte, M. 1996. **DNA fingerprinting techniques for microorganisms. A proposal for classification and nomenclature.** *Molecular Biotechnology* 6: 115-142
47. Ward, A.C. & Bora, N. 2006. **Diversity and biogeography of marine actinobacteria.** *Current Opinion in Microbiology* 9: 1-8.
48. Zhang, Z., Kudo, T., Nakajima, Y. & Wang, Y. 2001. **Clarification of the relationship between the members of the family *Thermomonosporaceae* on the basis of the 16S rDNA, 16S-23S rRNA internal transcribed spacer and 23S rDNA sequences and chemotaxonomic analyses.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 373-383.

10 REFERENCIAS

- a. http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Phylogenetic_tree_of_life_2.svg (12 de Junio de 2011).
- b. <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcrsteps.gif> (13 de Junio de 2011).
- c. <http://idibam.blogspot.com/2008/09/electroforesis-en-gel-de-agarosa.html> (17 de Febrero 2011).