



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO FENOTÍPICO DE ACTINOBACTERIAS  
MARINAS DEL GÉNERO *Micromonospora* AISLADAS  
DE SEDIMENTOS DEL GOLFO DE CALIFORNIA**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

WENDY MARLEN LARA GONZÁLEZ



México D.F

2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE: Profesor: ADRIANA GUADALUPE MEJIA CHAVEZ**

**VOCAL: Profesor: EDUARDO BONILLA ESPINOSA**

**SECRETARIO: Profesor: LUIS ANGEL MALDONADO MANJARREZ**

**1er SUPLENTE: Profesor: ROSALBA ESQUIVEL COTE**

**2do SUPLENTE: Profesor: BEATRIZ RUIZ VILLAFAN**

### **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: Wendy Marlen Lara González**

---

# ÍNDICE

Resumen	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1. El ambiente marino y su importancia	2
1.2. La clase <i>Actinobacteria</i>	5
1.3. La familia <i>Micromonosporaceae</i>	9
1.4. El género <i>Micromonospora</i>	9
1.5. Actinobacterias en el ambiente marino	11
1.6. Aspectos fenotípicos de la caracterización microbiana	13
<b>2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO</b>	16
<b>3. OBJETIVOS</b>	18
3.1. General	18
3.2. Particulares	18
<b>4. HIPÓTESIS</b>	18
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	19
5.1. Aislados microbianos	20
5.2. Caracterización fenotípica en diferentes medios de cultivo a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) y sales marinas (SM)	20
5.3. Caracterización fenotípica de diferentes fuentes de Carbono y Nitrógeno	21
<b>6. RESULTADOS</b>	24
6.1 Aislados microbianos	24
6.2 Estudio fenotípico	30
6.2.1 Caracterización en medio GYM/marino	30
6.2.2 Caracterización a diferentes concentraciones de NaCl y SM	32
6.2.3 Crecimiento de los aislados en diferentes fuentes de carbono	35

6.2.4 Crecimiento y características de los aislados en diferentes fuentes de nitrógeno	36
<b>7. DISCUSIÓN</b>	<b>39</b>
7.1 Aislados microbianos	39
7.2 Caracterización en medio GYM/marino	39
7.3 Caracterización en diferentes concentraciones de NaCl y SM	40
7.4 Caracterización fenotípica en diferentes fuentes de nitrógeno	42
7.5 Caracterización fenotípica en diferentes fuentes de carbono	43
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>45</b>
<b>9. PERSPECTIVAS</b>	<b>46</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>47</b>
<b>11. APÉNDICES</b>	<b>51</b>
11.1 Apéndice A: Medios de cultivo	51
11.2 Apéndice B: Buffers y soluciones	54
11.3 Apéndice C: Tablas de resultados	55
11.4 Apéndice D: Fuentes de nitrógeno	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Clasificación del entorno marino	3
2. Árbol filogenético de la vida construido a partir de secuencias de rRNA	6
3. Árbol filogenético con base en secuencias del gen del 16S ribosomal	7
4. Diferentes miembros del género <i>Micromonospora</i> mostrando los diferentes estadios de los cultivos	10
5. Morfología microscópica. <i>Micromonospora fulviviridis</i> mostrando esporas individuales	11
6. Esquema general del desarrollo experimental	19
7. Diseño del plato para la inoculación de los aislados	21
8. Prueba de crecimiento usando una sola fuente de carbono o nitrógeno. Diseño experimental	23
9. Ejemplo de algunos aislados que disminuyeron su crecimiento de medio GYM a medio GYM/marino	30
10. Ejemplo de la producción de esporas de diferentes aislados en los diferentes medios	31
11. Aislado BL-1 formación de micelio aéreo (MA)	33
12. Micelio aéreo de los aislados BL-4 y CV-4	35
13. Ejemplificación del crecimiento de los aislados en diferentes fuentes de nitrógeno	61

## ÍNDICE DE TABLAS

1. Actinomicetos aislados a partir de hábitats marinos	13
2. Fuentes de Carbono utilizadas para la caracterización	22
3. Fuentes de Nitrógeno utilizadas para la caracterización	22
4. Características generales de los aislados	24
5. Crecimiento de los aislados en medio GYM/marino (1% y 2% NaCl y SM)	31
6. Formación MA	33
7. Crecimiento de los aislados en diferentes fuentes de nitrógeno	37
8. Crecimiento de los aislados en medio GYM (1% y 2% NaCl y SM)	55
9. Crecimiento de los aislados en medio YEME (1% y 2% NaCl y SM)	56
10. Crecimiento de los aislados en medio GYEA (1% y 2% NaCl y SM)	57
11. Crecimiento de los aislados en medio AO (1% y 2% NaCl y SM)	58
12. Crecimiento de los aislados en diferentes fuentes de carbono	59

## RESUMEN

La clase *Actinobacteria* se refiere a bacterias Gram positivas con un alto contenido de Guanina y Citosina que incluye géneros de importancia económica y médica. Las *Actinobacterias* se encuentran ampliamente distribuidas en todos los ecosistemas pero datos precisos respecto a su distribución y diversidad en ambientes nacionales tanto marinos como terrestres es poca. En este sentido, se ha reportado al género *Micromonospora* como un componente microbiano usual de ambientes acuáticos entre los que destaca el Golfo de California o Mar de Cortés. En el presente trabajo, se estudiaron 30 aislados del género *Micromonospora* recuperados del Golfo de California (Maldonado *et. al.*, 2009; Segura, 2011). A los aislados de estudio se les realizaron pruebas fenotípicas para establecer sus perfiles bioquímicos para la utilización de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, así como su crecimiento en distintas concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) y sales marinas (SM) en 4 medios de cultivo diferentes (apéndice A): 1) agar glucosa extracto de levadura y malta (GYM), 2) agar extracto de levadura y malta (YEME), 3) agar glucosa extracto de levadura (GYEA) y 4) agar avena (OA), lo anterior con la finalidad de observar sus características macroscópicas, y así definir si los aislados pudieran representar nuevas especies.

El número de *Micromonosporas* que se evaluaron en el presente trabajo sugieren que la diversidad de estos microorganismos en el ambiente marino se encuentra muy por debajo de lo pensado, dejando la posibilidad de descubrir nuevas especies que pudieran tener alguna aplicación en el área médica como productores de metabolitos secundarios ya que es precisamente una especie de este género, *Micromonospora echinospora*, la productora de gentamicina; antibiótico utilizado principalmente para infecciones producidas por bacterias Gram negativas.

El presente estudio sugiere además que varios de los aislados muestran propiedades fisiológicas inusuales lo que apoya la idea de continuar estudiando aislados de muestras marinas nacionales así como internacionales.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. El ambiente marino y su importancia

Por muchos años se consideró que el suelo y el agua dulce eran el mayor reservorio de microorganismos. La tierra y el agua dulce varían significativamente en su estructura física y química; en el número y disponibilidad de nutrientes, en la temperatura y el pH. La combinación de todos estos factores influye directamente en la biodiversidad afectando el número de organismos presentes en un ecosistema. Los ecosistemas no son estáticos, por el contrario, evolucionan y cambian bajo condiciones determinadas. Por más de 3.500 millones de años que se cree apareció la vida, los microorganismos han sido testigos de un inmenso espectro de fuentes de energía y de condiciones ambientales, adaptándose adecuadamente a ellas (Hunter-Cevera, 1998).

Si tomamos en cuenta 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 existe una enorme cantidad de microorganismos desconocidos por el hombre. Apoyando lo anterior, un estimado donde se emplearon herramientas moleculares sugiere que la biodiversidad alcanza los  $3.6 \times 10^{29}$  células microbianas/mL en los océanos (Sogin *et al.*, 2006).

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

En este sentido, el aislar especies microbianas metabólicamente adaptadas al ambiente marino (autóctonas) realza en parte 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 contienen diversos hábitats (ventilas hidrotermales, lodos marinos profundos, géiseres, zonas litorales, entre otros) en los cuales habitan una gran cantidad de organismos, desde microscópicos hasta macroscópicos incluyendo los más grandes mamíferos. La mayor división de los seres vivos en el océano separa a los organismos en pelágicos (los que se encuentran en la columna de agua) y los bentónicos (los que viven en el suelo marino; Kennish, 2001).

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

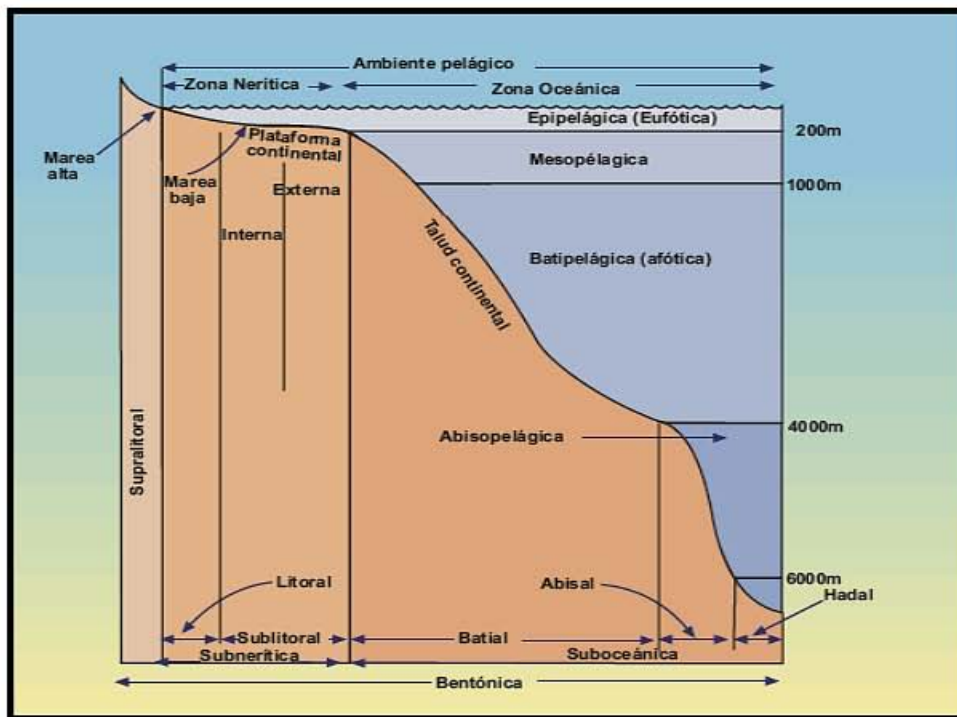


Figura 1. Clasificación del entorno marino

Fuente: <http://mardechile.cl/educacion/themes/Cool/images/libro/fig8-2.gif> junio 2008

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

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

La abundancia de las bacterias va disminuyendo desde la costa ( $1$  a  $3 \times 10^6$  células/mililitro [cel/mL]) hasta la zona nerítica ( $10^4$  a  $10^6$  cel/mL); Madigan & Martinko, 2006). Este comportamiento es similar en los fondos marinos, con la más alta cuenta bacteriana ( $10^{11}$  cel/mL) observada en los sedimentos lodosos de los estuarios (parte más ancha y profunda en la desembocadura de los ríos, mares abiertos o en los océanos) y cuentas menores en los sedimentos marinos profundos. La cuenta celular bacteriana así como la abundancia bacteriana también disminuye con el incremento de la profundidad dentro de los primeros 20 cm de la columna de sedimento. El mayor número de bacterias se alcanza en la interfase sedimento-agua en los primeros 2 cm de los sedimentos del fondo marino y declina progresivamente conforme aumenta la profundidad (Stach *et al.*, 2003). Hay una correlación entre lo mencionado anteriormente y la concentración de materia orgánica presente en la columna de agua y en el fondo de los sedimentos. El mayor número de bacterias y reproducción de las mismas ocurre en los sedimentos enriquecidos en materia orgánica o en concentraciones altas de carbón orgánico. Esto se debe a que las bacterias encuentran la mayor cantidad de nutrientes y las mejores condiciones de crecimiento (Kennish, 2001) en estos medios ó ambientes.

Las bacterias marinas son organismos unicelulares microscópicos ( $<2 \mu\text{m}$  de diámetro). De acuerdo a su clasificación nutricional se dividen en 4 grandes grupos: 1) quimioheterótrofo, que utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono y a su vez este mismo compuesto es la fuente de energía; 2) quimioautótrofo, que utilizan compuestos inorgánicos reducidos como fuente de energía y el  $\text{CO}_2$  como fuente de carbono; 3) fotoheterótrofo, que utilizan la luz

como fuente de energía y compuestos orgánicos como fuente de carbono; 4) fotoautótrofos, que utilizan la luz como fuente de energía y CO<sub>2</sub>. Las bacterias aeróbicas heterótrofas se encuentran generalmente en la columna de agua (cuerpo de agua uniforme) ya sea flotando o adjuntas a partículas, en la capa superior de los sedimentos del suelo marino y/o en los tejidos de animales o plantas. Las bacterias anaeróbicas habitan en profundidades mayores, es decir, capas de sedimentos anóxicos, caracterizados por una pobre circulación o aquellas regiones muy contaminadas (Kennish, 2001).

Debido a las características particulares de los océanos tales como la salinidad (3.3% - 3.7%), 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 algunas de 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***

El término actinomiceto tiene una larga historia. La primera descripción que se conoce de un “hongo radiado” (*actino* significa *rayo* y *miceto* es *hongo* en latín) aparentemente proviene del investigador alemán Ferdinand Cohn en 1875 (Hopwood, 2007). Con el paso de los años, el término se fue acuñando para incluir diferentes agrupaciones de microorganismos hasta la primera clasificación “formal” que propusieran Waksman y Henrici en 1943 para estos microorganismos que

inclusivo se llegaron a considerar como el “puente evolutivo” entre las bacterias y los hongos (Hopwood, 2007). Es desde estas fechas que diversos investigadores consideraban a este grupo precisamente como parte del Reino Fungi, sobre todo por sus características morfológicas macroscópicas y su desarrollo así como por su descripción original. No fue, sino hasta después de numerosos estudios y en particular al comparar secuencias ribosomales del gen 16S rRNA ribosomal que finalmente se estableció que los “hongos radiados” se encuentran relacionados filogenéticamente a las Eubacterias (Figura 2) específicamente ocupando un lugar cercano con las bacterias Gram positivas (Figura 3).

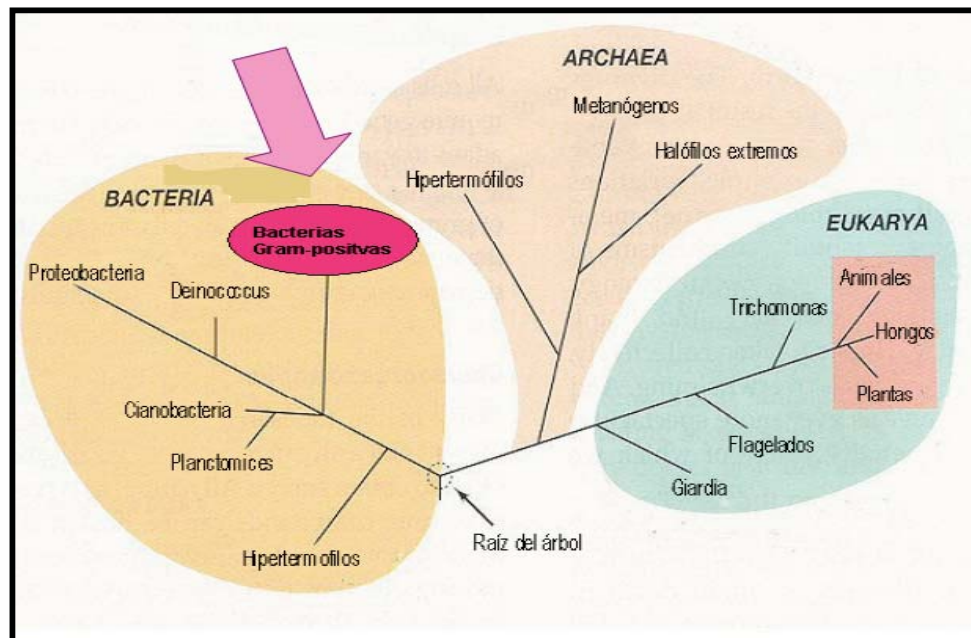


Figura 2. Árbol filogenético de la vida construido a partir de secuencias de rRNA. Sólo algunos grupos de cada dominio son mostrados. La flecha rosa indica la posición taxonómica de bacterias Gram positivas. Fuente: Ligeramente modificada por Lara González de Madigan & Martinko, 2006.

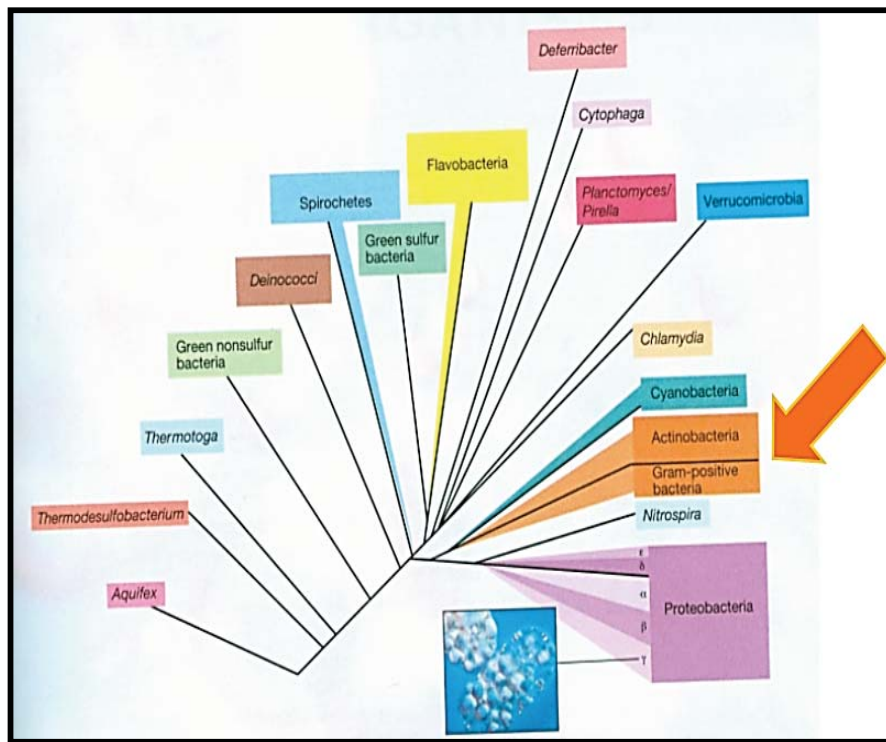


Figura 3. Árbol filogenético con base en secuencias del gen del 16S ribosomal. La flecha indica la posición taxonómica de la clase *Actinobacteria* Stackebrandt *et al.* 1997 dentro de las Eubacterias. Fuente: Ligeramente modificado por Lara González de Madigan & Martinko, 2006.

Una vez establecida la posición evolutiva, el término clase *Actinobacteria* (Stackebrandt *et al.*, 1997) es el que actualmente se utiliza para su denominación genérica aunque en muchas ocasiones sea el término original (es decir *actinomiceto*) el que siga prevaleciendo entre diferentes grupos de investigación. La clase *Actinobacteria* es un grupo extremadamente diverso que incluye diferentes familias, géneros y subórdenes. Por ejemplo, en enero del presente, esta clase comprendía 53 familias y 273 géneros (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). La gran mayoría de los géneros que comprende han sido aislados de fuentes terrestres ya que se consideraba a éste hábitat como su reservorio por excelencia. La presencia de éstos en otros hábitats sobre todo aquellos acuáticos era, por consecuencia, explicada en términos de que las esporas de estos microorganismos posiblemente habían sido arrastradas hacia el mar. En la actualidad existe evidencia que indica que varias especies son autóctonas del ambiente marino, en particular aquellas pertenecientes al género *Salinispora* (Maldonado *et al.*, 2005a) y por lo tanto, presentan una serie de adaptaciones a este ecosistema. Evidentemente el descubrimiento del género *Salinispora* ha contribuido a la apertura de una nueva

era en el biodescubrimiento de microorganismos de la clase *Actinobacteria* en éste hábitat.

La clase *Actinobacteria* está constituida por bacterias Gram positivas con alto contenido de Guanina-Citosina [G-C] donde la mayoría son aerobias y su morfología va desde bacilos cortos (por ejemplo el género *Arthrobacter*), cocos (por ejemplo el género *Micrococcus*) hasta aquellas que presentan hifas fragmentadas (por ejemplo en el género *Nocardia*) o micelio ramificado y altamente diferenciado como en el género *Streptomyces* (Ventura *et al.*, 2007). Casi todos los actinomicetos desarrollan un micelio filamentoso que puede permanecer unido a la superficie del sustrato, al cual se le denomina *micelio del sustrato*, o bien desarrollarse en la parte externa en cuyo caso se denomina *micelio aéreo*. Los filamentos individuales o hifas del micelio se subdividen en unidades, producto de un crecimiento de la pared celular hacia el interior de la hifa en intervalos regulares a lo largo de esta estructura. A este proceso se le denomina *septación* y cada una de las septas resultantes contiene una molécula de DNA (Holt *et al.*, 2000). Los actinomicetos son una fuente prolífica de diversos metabolitos secundarios, incluyendo muchos que poseen actividad biológica farmacéutica relevante (Berdy, 2005).

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

### 1.3 La familia *Micromonosporaceae*

El orden Actinomycetales contiene al suborden *Micromonosporineae* el cual pertenece a la familia *Micromonosporaceae* (Stackebrandt *et al.*, 1997). El trabajo de Stackebrandt y colegas menciona una colección de géneros de diversidad morfológica y quimio taxonómica que por sí mismo constituyen entidades fenotípicas diferentes. Como parte de investigaciones posteriores, se han ido agregando más géneros de la familia sumando a la fecha 26 válidamente descritos.

La familia *Micromonosporaceae* es una fuente prolífica de metabolitos bioactivos (la segunda después de la familia *Streptomycetaceae*), siendo el género *Micromonospora* el más representativo con una producción cercana a los 740 metabolitos, entre los cuales destaca la gentamicina (Bérdy, 2005).

Los géneros de la familia *Micromonosporaceae* que se han logrado aislar a partir de sedimentos marinos son: *Micromonospora*, *Verrucosipora*, *Salinospora* y *Actinoplanes* (Mincer *et al.*, 2002; Maldonado, 2005a, 2009. Goodfellow & Fiedler; 2010) lo que ha abierto la posibilidad de nuevos estudios tanto fisiológicos como genotípicos y/o taxonómicos.

### 1.4 El género *Micromonospora*

El género *Micromonospora* (Orskov) 1923 es Gram positivo, quimioorganótrofo, aerobio y como el resto de las *Actinobacterias* se caracteriza por tener un alto contenido de Guanina-Citosina en su genoma (Hirsch *et al.*, 2009).

Como parte del ciclo de vida de las especies del género *Micromonospora*, durante el desarrollo de la colonia la mayoría de las especies presentan una coloración naranja, la cual se va tornando negruzca durante la esporulación (Figura 4) (Suarez & Hardisson, 1985). Parte del proceso está caracterizado por un micelio ramificado bien desarrollado (0.2 – 0.6  $\mu\text{m}$  de diámetro) con esporas que nacen como únicas



sobre esporóforos cortos ya sean éstas esféricas u ovals (0.5 – 1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro) (Figura 5).

De acuerdo a la descripción general de este género no es común la presencia de micelio aéreo, y aparentemente no se considera como una característica taxonómica importante pero se sabe que algunos cultivos desarrollan una hifa aérea corta e infértil. Las especies válidamente descritas que presentan estas característica son *Micromonospora echinospora*, *Micromonospora rosaria*, *Micromonospora chersinia* y *Micromonospora rifamycinica* (Luedemann & Brodsky 1965; Horan & Brodsky 1986, Tomita *et al.*, 1992, Huang *et al.*, 2008).



Figura 4. Miembros del género *Micromonospora* mostrando los diferentes estadios de los cultivos.

Fuente: Maldonado & Quintana sin publicar



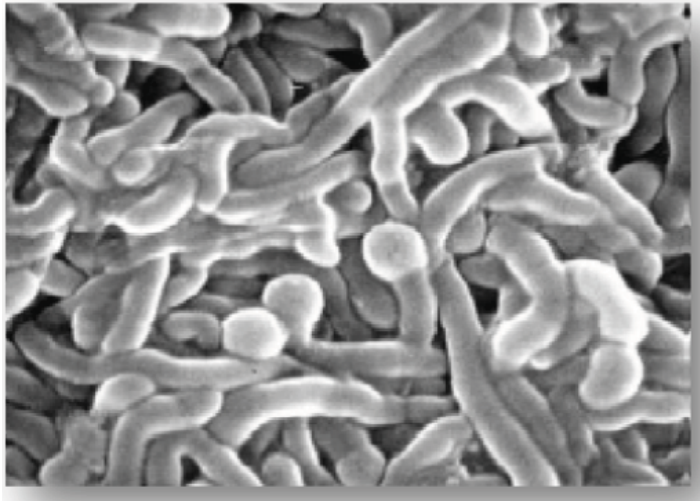


Figura 5. Morfología microscópica. *Micromonospora fulviviridis* mostrando esporas individuales. (Microscopía electrónica; Kroppenstedt *et al.*, 2005)

La identificación de las especies de *Micromonospora* queda entonces apoyada entre otras cosas en las características fenotípicas, tal como el crecimiento en medios especiales, los perfiles de utilización de carbono y nitrógeno, y la tolerancia a NaCl.

### 1.5 Actinobacterias en el ambiente marino

Los océanos cubren el 70% de la superficie terrestre y los organismos que ahí crecen son metabólicamente y fisiológicamente diferentes a los organismos terrestres. Bull y colaboradores (2000), propusieron que para entender la distribución y la naturaleza de las actinobacterias en el hábitat marino, es necesario responder algunas incógnitas como ¿son sujetos de dispersión ubicua?, ¿son parte de la microbiota nativa? o ¿son simplemente la consecuencia de un arrastre terrestre?

Puede asumirse que actinomicetos terrestres o marinos superficiales se han ido adaptando a diversas condiciones como lo son las altas presiones y otras condiciones propias de las profundidades de los océanos, sufriendo una especiación considerable, tal especiación a nivel de intraespecies es una razón para evaluar estos organismos respecto a su potencial biotecnológico (Bull *et al.*,

2000). Existen diversos reportes que indican que los actinomicetos se adaptan fisiológicamente a ambientes marinos, como se supone es el caso de *Micromonospora globosa*, la cual produce un antibiótico en presencia de agua marina pero no así en su ausencia (Imada *et. al.*, 2007).

Antes del 2005 solo tres géneros de la clase *Actinobacteria* eran reportados como parte del ambiente marino: *Micromonospora*, *Rhodococcus* y *Streptomyces* (Goodfellow & Haynes, 1984). Jensen y colaboradores (1991) reportaron que el número de aislados del género *Streptomyces* disminuía al aumentar la profundidad y distancia a partir de la costa a 450 metros de profundidad; mientras que el género *Micromonospora* aumentaba; en ese mismo estudio se mencionó que las especies recuperadas no tenían requerimientos especiales de agua marina.

Fue en el 2002 que Mincer y colaboradores aislaron por primera vez actinomicetos con requerimientos específicos de agua marina pero la descripción taxonómica completa de ese grupo de microorganismos se llevó a cabo hasta el 2005 por Maldonado y colaboradores (Maldonado *et. al.*, 2005a)

El género resultante, *Salinispora*, sintetiza extractos orgánicos con actividades antibióticas y anticancerígenas siendo el compuesto más estudiado y conocido hasta el momento la “salinosporamida” (Feling *et. al.*, 2003). El hallazgo de este género abrió un panorama intrigante sobre la diversidad de actinomicetos marinos y aclaró de alguna forma que en este existen poblaciones específicas de actinobacterias adaptadas a este hábitat y que posiblemente constituyen una diversidad nueva e inexplorada (Jensen *et. al.*, 2005). Bredholt y colaboradores en el 2008 realizaron la búsqueda de actinomicetos de sedimentos marinos recolectados en los Fiordos Noruegos, donde evidenciaron que el género dominante en sedimentos profundos fue *Micromonospora*.

A la fecha alrededor de 50 géneros de actinomicetos se han aislado del ambiente marino (Tabla 1). Todo esto ha generado nuevas búsquedas de actinomicetos en sedimentos que dan como resultado el descubrimiento de nuevas especies nunca

antes reportadas en estos ambientes (Maldonado *et al.*, 2005a, 2009; Bredholt *et al.*, 2008; Godfellow & Fiedler, 2010).

**Tabla 1.** Actinomicetos aislados a partir de hábitats marinos y terrestres.

<b>Aislados asignados a taxa conocidos</b>			
<i>Actinocorallia</i>	<i>Actinomadura</i>	<i>Actinoplanes</i>	<i>Aeromicrobium</i>
<i>Amycolaptopsis</i>	<i>Arthrobacter</i>	<i>Arsenicococcus</i>	<i>Brevibacterium</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Dermacoccus</i>	<i>Dietzia</i>	<i>Glycomyces</i>
<i>Gordonia</i>	<i>Isoptericola</i>	<i>Knoella</i>	<i>Kocuria</i>
<i>Microbacterium</i>	<i>Microbispora</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Micromonospora</i>
<i>Mycobacterium</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Nocardioides</i>	<i>Nocardiopsis</i>
<i>Nonomuraea</i>	<i>Prauserella</i>	<i>Pseudonocardia</i>	<i>Rhodococcus</i>
<i>Saccharoolyspora</i>	<i>Sanguibacter</i>	<i>Streptosporangium</i>	<i>Tessaracoccus</i>
<i>Streptomyces</i>	<i>Tsukamurella</i>	<i>Verrucosispora</i>	<i>Williamsia</i>
<b>Aislados constituyentes de taxa nuevos</b>			
<i>Actinoaurantisora</i>	<i>Demequina</i>	<i>Euzebya</i>	<i>Iamia</i>
<i>Marinactinispota</i>	<i>Marisedimenicola</i>	<i>Miniinuna</i>	<i>Phycicola</i>
<b>**Salinibacterium</b>	<b>**Salinispota</b>	<i>Sciscionella</i>	<b>**Serinicoccus</b>

\*\*Actinomicetos únicamente encontrados en ambientes marinos.

Fuente: Goodfellow & Fiedler, 2010

## 1.6 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 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. Además para la síntesis de proteínas se requiere en general de L-aminoácidos, también son necesarios algunos D-aminoácidos, y en algunos casos se requiere de péptidos de histidina.

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

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

mayor parte de las vitaminas son constituyentes de co-enzimas (Madigan & Martinko, 2006).

Entre las diferentes pruebas empleadas para la caracterización microbiana, la utilización del carbono y el nitrógeno que son considerados macronutrientes esenciales, 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 de 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 de 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).

## 2. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

El presente trabajo es de gran importancia en la investigación de Actinomicetos ya que no se tienen reportes o estudios actuales sobre este tema, específicamente para el género *Micromonospora*. Además, debido a que las disciplinas biológicas entre ellas la microbiología, han tenido grandes avances en los últimos años, inclusive revolucionadas completamente con el empleo de la biología molecular, el presente trabajo podría tener implicaciones a futuro para incorporar técnicas de biología molecular a un estudio más profundo de lo observado micro y macroscópicamente.

Considerando que el agua del océano cubre gran parte del planeta y que este constituye un gran reservorio de microorganismos, no es raro pensar en la posibilidad de descubrir nuevas especies que pudieran producir moléculas bioactivas de utilidad comercial y de beneficio para la humanidad. Además, no ha sido sino hasta la aplicación de técnicas moleculares que se ha estimado la increíble extensión de la diversidad microbiana por lo que es evidente que el mundo marino representa una fuente inexplorada de descubrimiento ya que constituye por si mismo un extraordinario reservorio microbiano de estudio.

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

En particular en las últimas dos décadas miembros de la clase *Actinobacteria* han sido aislados de ecosistemas marinos y muchos de ellos han revelado su capacidad de producir nuevos antibióticos y anticancerígenos. La búsqueda de microorganismos de origen marino es una realidad y habiendo pocos grupos de investigación en México que se dedican al saber de este tema es que la presente propuesta significa el primer trabajo de su tipo a nivel nacional, en particular para estudiar microorganismos aislados de sedimentos marinos del Golfo de California en donde se pudiera tratar de establecer su posición taxonómica a través del descubrimiento de nuevas especies microbianas relacionadas al ambiente marino así como de propiedades micro y/o macroscópicas inusuales.

### 3. OBJETIVO

#### 3.1 General

- Caracterizar fenotípicamente *Actinobacterias* del género *Micromonospora* aisladas del Golfo de California (conocido también como Mar de Cortés), de la República Mexicana.

#### 3.2 Particulares

- Evaluar el crecimiento y características macroscópicas (esporulación y formación de micelio aéreo) en diferentes medios de cultivo (GYM, YEME, GYEA y OA), y con diferentes concentraciones de NaCl y SM.
- Evaluar el crecimiento y características macroscópicas en el medio de cultivo GYM/marino.
- Evaluar el crecimiento de los aislados utilizando diferentes sustratos como única fuente de carbono (C) y nitrógeno (N).

### 4. HIPÓTESIS

Las *Actinobacterias* aisladas tendrán características diferentes como la esporulación y la formación de micelio aéreo, al ser evaluadas en diferentes medios de cultivo y concentraciones de NaCl y SM, donde darán las características propias del género *Micromonospora*, cumpliendo así con (tal vez) una parte de su ciclo de vida.



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS.

La estrategia experimental utilizada en el presente trabajo se resume en el siguiente diagrama:

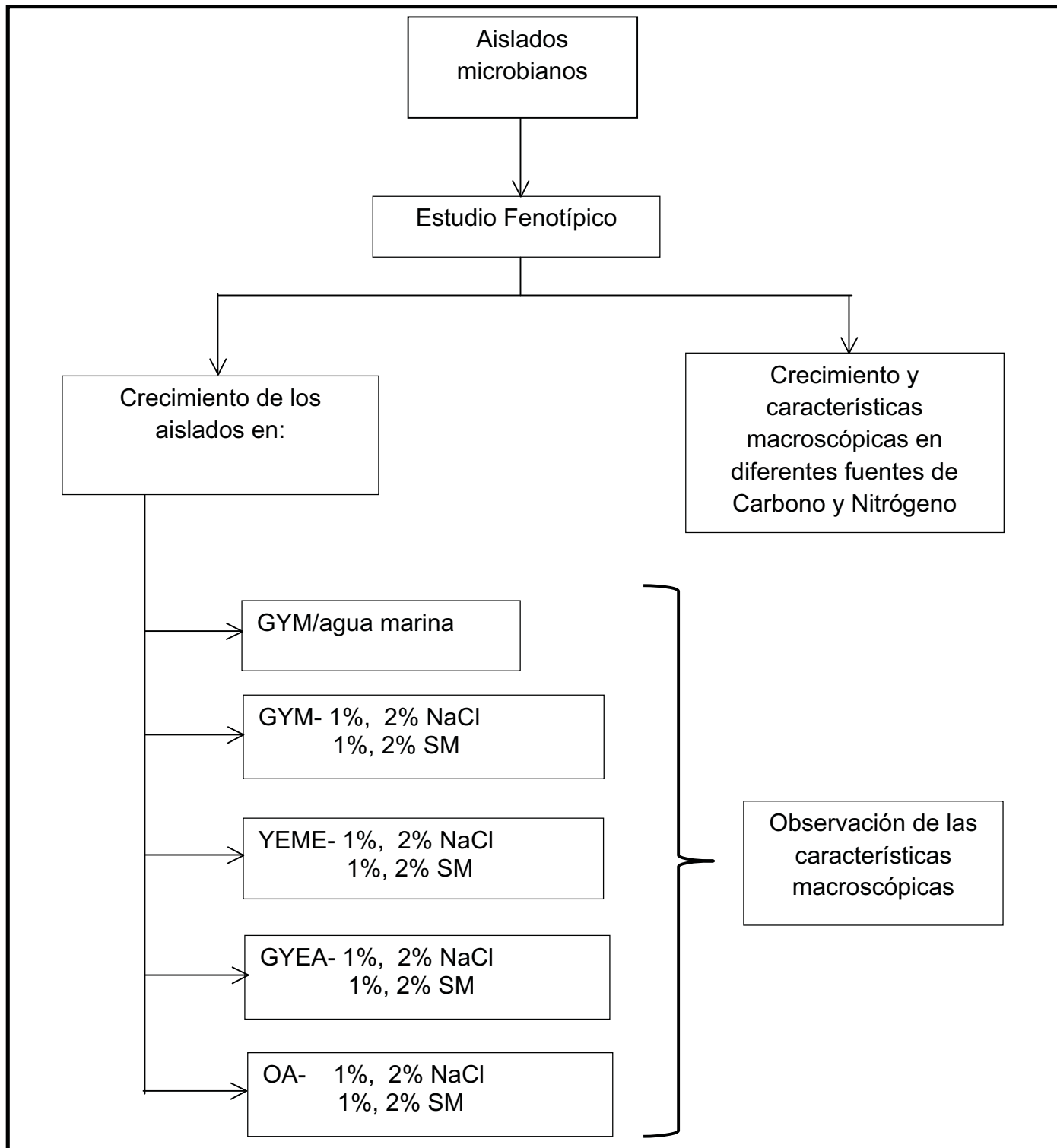


Figura 6: Esquema General del Desarrollo Experimental

## **5.1 Aislados Microbianos**

Los aislados se obtuvieron de sedimentos marinos recolectados en el Golfo de California en estudios previos desarrollados en el Laboratorio de Recursos Microbianos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL-UNAM-CU; Dr. Luis Ángel Maldonado Manjarrez). Las muestras de sedimento se recolectaron en el año 2006 durante la campaña oceanográfica DIPAL-1, a bordo del buque oceanográfico “El Puma” propiedad de la Universidad Nacional Autónoma de México.

En el presente trabajo se seleccionaron 30 aislados que se identificaron con las claves BA-1, BA-2, BA-9, BA-13, BA-15, BA-18, BD-1, BD-3, BL-1, BL-3, BL-4, BL-6, BL-8, BL-9, BL-10, BL-12, CV-4, CV-5, CV-7, CV-11, CV-13, CV-20, DU-2, DU-4, DU-6, DU-10, DU-11, DU-12, DX-9 BL-8, BL-9, BL-10, BL-12, CV-4, CV-5, CV-7, CV-11, CV-13, CV-20, DU-2, DU-4, DU-6, DU-10, DU-11, DU-12, DX-9 y DX-12. Los aislados se sembraron en agar extracto de malta (GYM del inglés, Apéndice A), usando la técnica de estría cruzada para corroborar su pureza, estos platos se incubaron a una temperatura de 30°C. Posteriormente se realizó una suspensión de biomasa en solución salina isotónica 0.9% estéril como método de conservación, estas suspensiones se mantuvieron a una temperatura de 4°C.

## **5.2 Caracterización Fenotípica en diferentes medios con diferentes concentraciones de NaCl y sales marinas (SM)**

Se prepararon 4 medios de cultivo: GYM, YEME, GYEA y OA, a concentraciones de 0%, 1% y 2% de NaCl y SM para cada medio. Para el caso del control se trabajó en medio GYM utilizando agua marina.

En cada caja se inocularon 4 aislados (Figura 7), esto fue tomando 7µL con una micropipeta Gilson (Gilson, Francia), de la suspensión de biomasa y vertiendo en el plato a modo de gota.

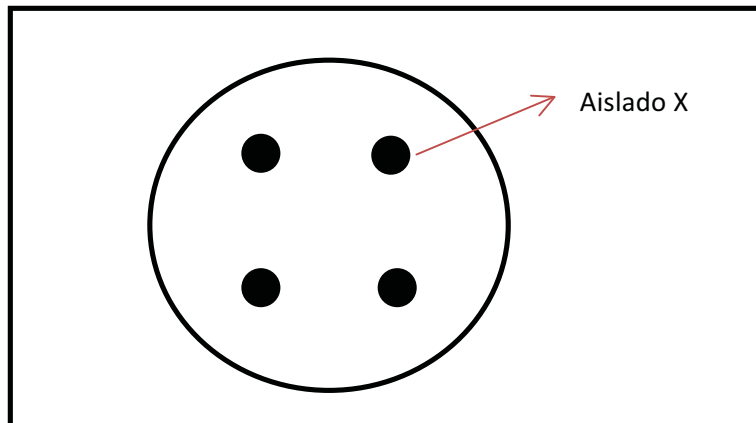


Figura 7: Diseño experimental de la inoculación de los aislados en las cajas.

Posteriormente los platos se incubaron a 30°C. Se observó el crecimiento de los aislados a los 14, 21, y 28 días de incubación, evaluando las características macroscópicas, y observando por el estereoscopio las microscópicas.

Esto procedimiento se realizó para cada uno de los medios y cada una de las concentraciones; se les tomó fotografía y se registraron los resultados en tablas de Excel (Microsoft Corp, EUA).

### 5.3 Caracterización fenotípica en diferentes fuentes de Carbono y Nitrógeno

Para las pruebas de fuentes de carbono y nitrógeno se tomaron 7 $\mu$ L de la suspensión de biomasa y se inocularon en placas de 24 pozos con medio basal ISP-9 (del inglés, *International Streptomyces Project*; Williams *et al.*, 1983), suplementado con 1.0% (p/v) de la fuente de carbono correspondiente (Tabla 2), o medio basal (MB; Shirling & Gottlieb, 1966) suplementado con 0.1% (p/v) de la fuente de nitrógeno correspondiente (Tabla 3).

**Tabla 2: Fuentes de Carbono utilizadas para la caracterización.**

<b>Fuente de C</b>	<b>Tipo</b>	<b>Fuente de C</b>	<b>Tipo</b>
1. <b>Ácido malónico</b>	Ácido dicarboxílico	14. <b>D(-) Manitol</b>	Polialcohol
2. <b>Adonitol</b>	Polialcohol	15. <b>D(+) Manosa</b>	Monosacárido
3. <b>Almidón</b>	Polisacárido	16. <b>D(+) Melecitosa</b>	Trisacárido
4. <b>D(-) Arabinosa</b>	Monosacárido	17. <b>D(+) Melibiosa</b>	Disacárido
5. <b>Celobiosa</b>	Disacárido	18. <b>D(+) Rafinosa</b>	Trisacárido
6. <b>Celulosa</b>	Polisacárido	19. <b>L(+) Ramnosa</b>	Monosacárido
7. <b>D(-) Fructosa</b>	Monosacárido	20. <b>D(-) sorbitol</b>	Polialcohol
8. <b>D(-) Galactosa</b>	Monosacárido	21. <b>Sacarosa</b>	Disacárido
9. <b>Glicerol</b>	Alcohol	22. <b>Sorbosa</b>	Monosacárido
10. <b>Glucosa</b>	Monosacárido	23. <b>D(+) Trehalosa</b>	Disacárido
11. <b>Inositol</b>	Polialcohol	24. <b>D(+) Xilitol</b>	Polialcohol
12. <b>α-Lactosa</b>	Disacárido	25. <b>D(+) xilosa</b>	Monosacárido
13. <b>D(+) Maltosa</b>	Disacárido		

**Tabla 3: Fuentes de Nitrógeno utilizadas para la caracterización.**

<b>Fuente de N</b>	<b>Tipo</b>	<b>Fuente de N</b>	<b>Tipo</b>
1. <b>Adenina</b>	Base nitrogenada	9. <b>Metionina</b>	Azufrado
2. <b>Ac. Aspártico</b>	Ácido	10. <b>Ornitina</b>	Dibásico
3. <b>Ac. Glutámico</b>	Ácido	11. <b>Prolina</b>	Cíclico
4. <b>Arginina</b>	Básico	12. <b>Serina</b>	Neutro
5. <b>Alanina</b>	Alifático	13. <b>Tirosina</b>	Aromático
6. <b>Fenilalanina</b>	Aromático	14. <b>Triptófano</b>	Aromático
7. <b>Histidina</b>	Básico	15. <b>Valina</b>	Alifático
8. <b>isoleucina</b>	alifático		

Tanto las fuentes de carbono como las de nitrógeno fueron esterilizadas por el método de tindalización, el cual se utiliza cuando las sustancias químicas no pueden calentarse por encima de los 100°C para evitar su modificación química. Las soluciones preparadas de las 25 fuentes de carbono y las 15 fuentes de nitrógeno se calentaron a 100°C por tres días consecutivos. Se pesó 1g de las fuentes de carbono y 0.1g para las fuentes de nitrógeno, las cuales se disolvieron en 20 mL de agua bidestilada. Al mismo tiempo se preparó el medio ISP-9 y MB (apéndice A), tanto para las fuentes de carbono como las de nitrógeno respectivamente, estos medios se esterilizaron a 120°C por 15 min a una presión de 15 Lb. Posterior a la esterilización los medios se dejaron enfriar aproximadamente a 45°C se les agregó la fuente de carbono o de nitrógeno según sea el caso y se vertieron en las placas de 24 pozos y al solidificar se procedió con la inoculación de los aislados (Figura 8).

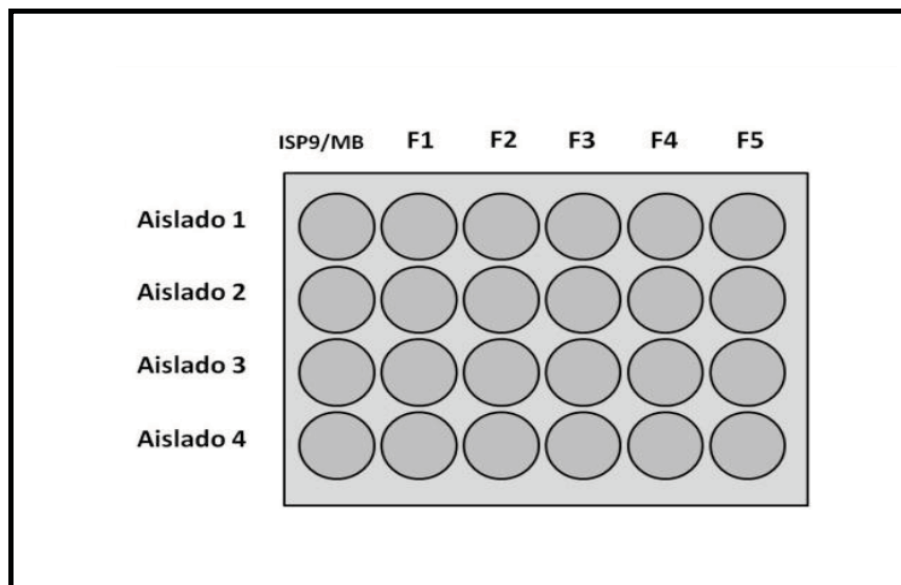


Figura 8: Diseño experimental para la prueba de crecimiento usando una sola fuente de carbono o nitrógeno.





Las placas se incubaron a 30°C, y el crecimiento de los aislados se evaluó a los 7, 14 y 21 días, se registró en tablas los aislados que presentaron crecimiento y las características de crecimiento.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Aislados Microbianos.

En la siguiente tabla se describen las características macroscópicas generales de algunos de los aislados en medio GYM a 21 días de incubación a 30°C.

Tabla 4: Características generales de los aislados

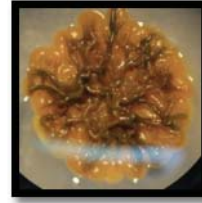
<p>BA-1</p>  <p><b>Forma:</b> regular <b>Aspecto:</b> rugosa <b>Color:</b> naranja <b>Esporulación:</b> negativa <b>Micelio aéreo:</b> negativo</p>	<p>BA-2</p>  <p><b>Forma:</b> regular <b>Aspecto:</b> rugosa <b>Color:</b> naranja <b>Esporulación:</b> mínima <b>Micelio aéreo:</b> negativo</p>
<p>BA-9</p>  <p><b>Forma:</b> regular <b>Aspecto:</b> rugosa <b>Color:</b> naranja <b>Esporulación:</b> positivo, esporas negras y limitantes. <b>Micelio aéreo:</b> negativo</p>	<p>BA-13</p>  <p><b>Forma:</b> regular <b>Aspecto:</b> rugosa <b>Color:</b> naranja <b>Esporulación:</b> negativo <b>Micelio aéreo:</b> negativo</p>

BA-15



**Forma:** irregular  
**Aspecto:** rugosa-seca  
**Color:** naranja -opaca  
**Esporulación:** positivo, negra  
**Micelio aéreo:** negativo

BA-18



**Forma:** regular  
**Aspecto:** mucoide  
**Color:** naranja-brillante  
**Esporulación:** positivo, cafés  
**Micelio aéreo:** negativo

BD-1



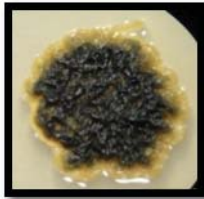
**Forma:** regular  
**Aspecto:** rugosa-mucoide  
**Color:** naranja-negra  
**Esporulación:** positivo, negras  
**Micelio aéreo:** negativa

BD-3



**Forma:** regular  
**Aspecto:** mucoide  
**Color:** negra, amarillo  
**Esporulación:** (+ negra  
**Micelio aéreo:** negativa

BL-1



**Forma:** irregular  
**Aspecto:** butirosa-rugosa  
**Color:** naranja-negra  
**Esporulación:** positiva, negra  
**Micelio aéreo:** negativo

BL-3



**Forma:** irregular  
**Aspecto:** rugosa-seca  
**Color:** naranja-pálido  
**Esporulación:** negativo  
**Micelio aéreo:** negativo

BL-4



**Forma:** regular  
**Aspecto:** rugosa  
**Color:** naranja-opaca  
**Esporulación:** negativo  
**Micelio aéreo:** negativo

BL-6



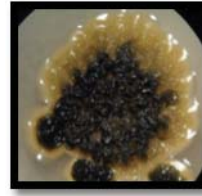
**Forma:** regular  
**Aspecto:** rugosa  
**Color:** naranja  
**Esporulación:** negativa  
**Micelio aéreo:** negativa

BL-8



**Forma:** regular  
**Aspecto:** rugosa-seca  
**Color:** naranja  
**Esporulación:** negativa  
**Micelio aéreo:** negativa

BL-9



**Forma:** irregular, borde plano  
**Aspecto:** rugosa  
**Color:** naranja-negra  
**Esporulación:** positivo, céntrica  
**Micelio aéreo:** negativo

BL-10



**Forma:** irregular, orillas planas  
**Aspecto:** rugosa-seca  
**Color:** naranja-opaca, grisáceo  
**Esporulación:** mínimo, gris  
**Micelio aéreo:** negativo

BL-12



**Forma:** regular, plana  
**Aspecto:** rugosa  
**Color:** naranja-opaca  
**Esporulación:** negativo  
**Micelio aéreo:** negativo



CV-4



**Forma:** regular, borde plano  
**Aspecto:** rugosa-butirosa  
**Color:** naranja-opaca  
**Esporulación:** positiva, negra  
**Micelio aéreo:** negativo

CV-5



**Forma:** regular  
**Aspecto:** rugosa  
**Color:** naranja intenso  
**Esporulación:** negativo  
**Micelio aéreo:** negativo

CV-7



**Forma:** regular, borde plano  
**Aspecto:** rugosa-seca  
**Color:** amarillo-negro  
**Esporulación:** positiva, negra-gris  
**Micelio aéreo:** negativo

CV-11



**Forma:** irregular  
**Aspecto:** rugosa-butirosa  
**Color:** crema-café  
**Esporulación:** positiva, café concéntrica,  
profunda  
**Micelio aéreo:** negativo

CV-13



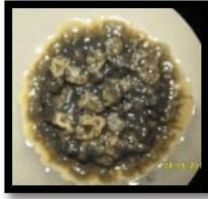
**Forma:** regular  
**Aspecto:** rugosa-brillosa  
**Color:** naranja-café  
**Esporulación:** positiva, dispersa  
**Micelio aéreo:** negativo

CV-20



**Forma:** regular  
**Aspecto:** rugosa  
**Color:** naranja-gris  
**Esporulación:** mínima, gris  
**Micelio aéreo:** negativo

DU-2



**Forma:** regular  
**Aspecto:** rugosa-mucoide  
**Color:** negra-naranja  
**Esporulación:** positiva, negra  
**Micelio aéreo:** negativo

DU-4



**Forma:** irregular  
**Aspecto:** rugosa-seca  
**Color:** naranja-negra  
**Esporulación:** positiva, negra  
**Micelio aéreo:** negativo

DU-6



**Forma:** Irregular  
**Aspecto:** plana, granulosa  
**Color:** naranja  
**Esporulación:** positiva, ciertas regiones  
**Micelio aéreo:** negativo

DU-10



**Forma:** regular  
**Aspecto:** rugosa  
**Color:** naranja-pálido  
**Esporulación:** negativo  
**Micelio aéreo:** negativo

DU-11

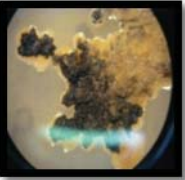



**Forma:** regular, orilla plana  
**Aspecto:** rugosa  
**Color:** naranja-negro  
**Esporulación:** positiva, negro-café  
**Micelio aéreo:** negativo

DU-12



**Forma:** regular, orilla plana  
**Aspecto:** rugosa-seca  
**Color:** naranja  
**Esporulación:** positiva, gris por colonias  
**Micelio aéreo:** negativo

<p>DX-9</p>  <p><b>Forma:</b> irregular  <b>Aspecto:</b> rugosa-seca  <b>Color:</b> naranja-negro  <b>Esporulación:</b> positiva, negra  <b>Micelio aéreo:</b> negativo</p>	<p>DX-12</p>  <p><b>Forma:</b> regular  <b>Aspecto:</b> rugosa-mucoide  <b>Color:</b> negro-naranja  <b>Esporulación:</b> positiva, negra  <b>Micelio aéreo:</b> negativo</p>
--	---

Los aislados presentaron inicialmente un color naranja a los 7 días de crecimiento, el aislado BA-18 presentó una coloración café indicando la producción de esporas, los demás aislados que presentaron la esporulación fue a partir de los 14 días de crecimiento y en los aislados BA-18, BD-3 y DU-2 la colonia se tornó en un composición viscosa. Ninguno de los aislados presentó la formación de micelio aéreo. El medio GYM fue el mejor medio para el crecimiento de los aislados pertenecientes al género *Micromonospora*, por tal motivo se maneja como el medio control.

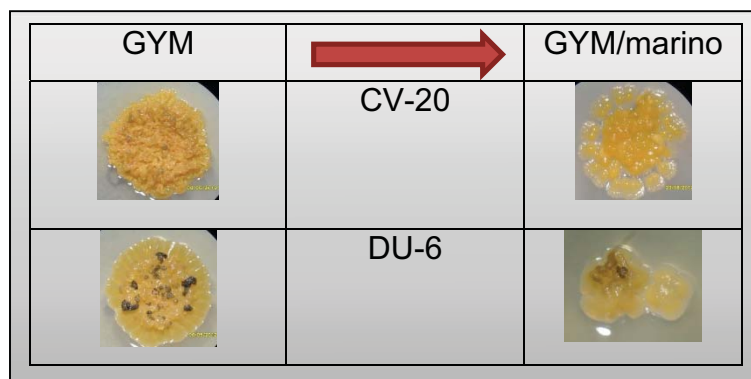
En el medio YEME los aislados presentaron características morfológicas muy similares a las presentados en GYM, dando unas mínimas diferencias en el crecimiento y en la esporulación (apéndice C). En medio GYEA las diferencias en cuanto al crecimiento de la colonia si fueron más notorias presentando una densidad menor, de igual manera la esporulación disminuyó en aquellos aislados que presentaban una gran cantidad (apéndice C), y por último en medio OA las diferencias presentadas fueron muy significativas, ya que la características morfológicas de las colonias eran muy distinta, ya que las colonias se tornaban desde una coloración beige hasta blancas o sin color, el crecimiento era

significativamente menor y la coloración de las esporas también tenían tonalidades diferentes, desde gris hasta verdes (apéndice C).

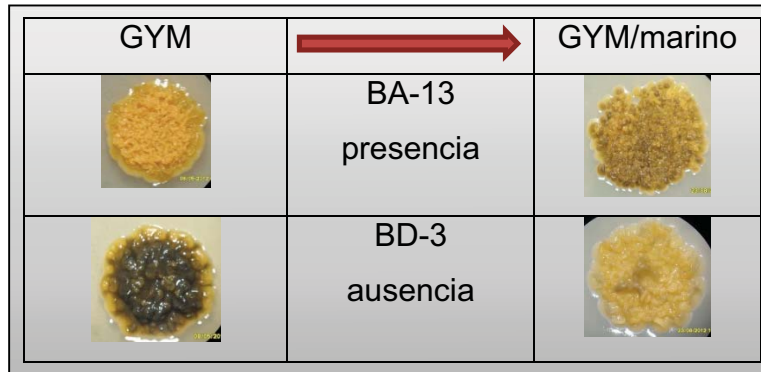
## 6.2 ESTUDIO FENOTÍPICO

### 6.2.1 Caracterización en GYM/marino

Las características morfológicas que presentaron los aislados al ser sembrados en medio GYM/marino no fueron muy distintas a las presentadas en el punto 5.1. Sin embargo se pudo apreciar un crecimiento menor en la mayoría de los aislados en especial en los aislados CV-20 y DU-6 (figura 9); así como diferencias en la esporulación de algunos aislados, por ejemplo la presencia de esporulación en BA-13 y DU-10 (figura 10), y la ausencia de este en BA-15, BD-3 y CV-13.



**Figura 9:** Ejemplo de algunos aislados que disminuyeron su crecimiento de GYM a GYM/marino



**Figura 10:** Ejemplo de la producción de esporas de diferentes aislados en los diferentes medios

Las características totales de cada uno de los aislados sembrados en GYM/marino se presentan en la tabla 5, reportando su crecimiento y esporulación.

Tabla 5: Crecimiento de los aislados en medio GYM/marino (1% y 2% NaCl y SM)

AISLADO	GYM/marino			AISLADO	GYM/marino		
	Cre	E	MA		Cre	E	MA
BA-1	+++	-	-	BL-12	++	-	-
BA-2	++	-	-	CV-4	++	-	-
BA-9	+	+	-	CV-5	+	-	-
<b>BA-13</b>	<b>+++</b>	<b>++</b>	-	CV-7	++	+	-
BA-15	++	min	-	CV-11	+	-	-
BA-18	++	++	-	CV-13	+	-	-
BD-1	++	+	-	CV-20	+	-	-
BD-3	++	+	-	DU-2	++	++	-
<b>BL-1</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	-	DU-4	++	++	-
BL-3	++	-	-	DU-6	min	+	-
BL-4	++	-	-	DU-10	++	+	-
BL-6	++	-	-	<b>DU-11</b>	<b>++</b>	<b>+++</b>	-
<b>BL-8</b>	<b>+++</b>	<b>+</b>	-	DU-12	+	+	-
BL-9	++	++	-	<b>DX-9</b>	<b>++</b>	<b>+++</b>	-
BL-10	++	min	-	<b>DX-12</b>	<b>++</b>	<b>+++</b>	-

### 6.2.2 Caracterización a diferentes concentraciones de NaCl y SM

El crecimiento de los aislados, así como sus características morfológicas en las diferentes concentraciones de NaCl fue disminuyendo conforme la concentración aumentó, así mismo la capacidad de esporulación, llegando haber casos en donde no se presentó ni crecimiento ni esporulación en algunos aislados, en el caso de las SM se observó un mejor crecimiento y una mayor esporulación en los aislados en ambas concentraciones. En general las características morfológicas se conservan excepto en el medio OA donde se puede observar un crecimiento mínimo o nulo en muchos de los aislados en todas las concentraciones trabajadas. Todas las características se encuentran registradas en tablas en el apéndice C.

Cuatro aislados de los 30 estudiados presentaron la formación de micelio aéreo. El micelio aéreo (también denominado como “reproductivo”) crece hacia la superficie externa del medio y es el responsable de formar las estructuras de reproducción que generarán o darán origen a nuevos micelios; con el género *Streptomyces* como el mejor ejemplo. El aislado BL-1 fue en el que se observó mayor cantidad de micelio aéreo (figura 11). El micelio aéreo lo presentó en medio GYM al 1% NaCl y al 1% y 2% SM, en medio YEME al 1% NaCl y 1% y 2% SM, en medio GYEA y OA no presentó micelio aéreo a ninguna concentración; para el aislado BL-4 la presencia de micelio aéreo solo fue en medio OA en la concentración de 1% en SM presentando una cantidad mínima de esta característica; el aislado BL-9 presentó el micelio aéreo en medio GYM en todas las concentraciones de NaCl y SM y en medio YEME solo lo presentó en la presencia de SM y el último aislado que presentó la producción de micelio aéreo fue CV-4 y sólo lo hizo en medio GYM a una concentración del 1% de NaCl.

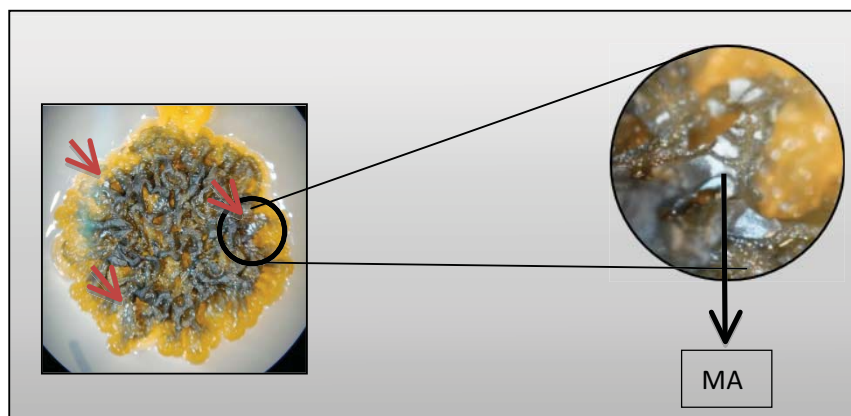











Figura 11: Aislado BL-1 formación del micelio aéreo (MA); la flecha roja indica presencia de MA.

Aquellos aislados en que se detectó la formación de micelio aéreo, se les observó a detalle por estereomicroscopía con los resultados en la tabla 6.

Tabla 6: Formación MA

Aislado	BL-1	BL-9
GYM 1% NaCl		
GYM 2% NaCl		

<b>GYM</b> <b>1% SM</b>		
<b>GYM</b> <b>2% SM</b>		
<b>YEME</b> <b>1% NaCl</b>		-----
<b>YEME</b> <b>1% SM</b>		
<b>YEME</b> <b>2% SM</b>		

Nota: las fotos fueron tomados en un microscopio estereoscópico, las flechas rojas indican el micelio aéreo.

El aislado BL-1 fue el que presentó MA en más medios, en concentraciones de NaCl y SM de 1% y 2%, lo interesante es observar que en concentraciones del 2% ya sea de NaCl o de SM su esporulación es muy distinta, siendo en concentraciones del 1% una esporulación completa de color negro y en



concentración del 2% una esporulación limitada con un color grisáceo. El siguiente aislado con mayor formación de MA es el BL-9 donde sus características morfológicas son muy variables en los medios así mismo la esporulación fue notable a nula en el caso del medio de GYM al 2% NaCl. Los aislados BL-4 y CV-4 solo presentaron la formación del MA en un solo medio en AO 1% SM y GYM 1% NaCl respectivamente. Para el aislado BL-4 hay poco crecimiento y no hay esporulación y hay partes de la colonia que no tiene pigmento, y para el CV-4 hay un buen crecimiento pero tampoco presenta esporulación (figura 12)

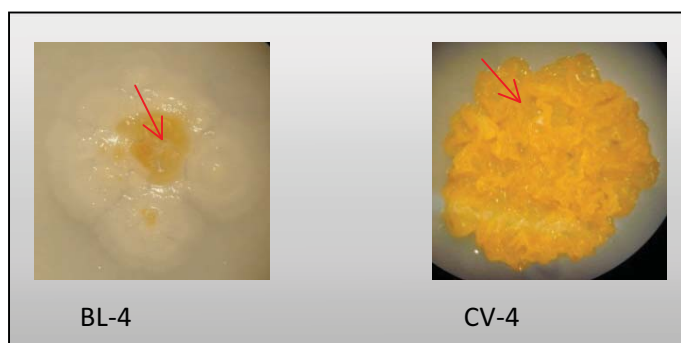


Figura 12: Micelio aéreo en aislados BL-4 y CV-4 (flecha roja)

### 6.2.3 Crecimiento de los aislados en diferentes fuentes de carbono.

En general los aislados no crecieron muy bien en las diferentes fuentes de carbono. En los medios que contenían como única fuente de carbono el sorbitol, xilitol, glicerol, ácido malónico, adonitol e inositol no presentaron crecimiento de ninguno de los aislados. De igual forma los aislados BA-1, BL-1, BL-4, BL-6, BL-8, BL-9, CV-20 y DX-9 no presentaron crecimiento en ninguna fuente de carbono.

Las fuentes de carbono que presentaron un mejor crecimiento entre los aislados son melobiosa, lactosa, galactosa, celobiosa, arabinosa, sucrosa, rhamnosa, rafinosa y xilosa que en promedio crecieron 10 aislados diferentes en cada medio; las demás fuentes de carbono presentaron en promedio entre 2 y 4 aislados de

crecimiento. Pocos fueron los aislados que presentaron esporulación; de los aislados que presentaron un mejor crecimiento y mejor mecanismo de esporulación son BA-18 y BD-3. Todos los resultados de cada aislado en cada fuente de carbono se encuentran en la tabla 12 (apéndice C).

#### **6.2.4 Crecimiento y características de los aislados en diferentes fuentes de nitrógeno.**

En general se presentó un buen crecimiento en la mayoría de las fuentes de nitrógeno y de la mayoría de los aislados, en la tabla 7 se encuentran los resultados de la capacidad de los aislados para utilizar las diferentes fuentes de nitrógeno empleados en el presente trabajo, donde se observa el resultado de crecimiento así como la capacidad de esporulación de estos aislados.

En las fuentes de nitrógeno de ácido glutámico y ácido aspártico no se presentó crecimiento de ninguno de los aislados, así mismo las fuentes de adenina e histidina solo presentaron crecimientos mínimos de algunos aislados por ejemplo de adenina solo el aislado BD-1 presentó un crecimiento aceptable y de histidina el BA-18. En las demás fuentes hubo buen crecimiento, aunque la esporulación se presentó poco en los aislados siendo el aislado BA-18 en el que se presentó mayor esporulación en casi todas las fuentes utilizadas. El aislado BL-9 presentó muy poco crecimiento en las fuentes siendo solo en metionina donde el crecimiento fue aceptable. Algunos ejemplos del crecimiento de los aislados en las diferentes fuentes de nitrógeno los encontraremos en la figura 12 (apéndice D).

Tabla 7: Crecimiento de los aislados en las diferentes fuentes de Nitrógeno.

AISLADO	FENILALANINA		Ac. GLUT.		Ac. ASPAR.		ORNITINA		ALANINA		SERINA		ISOLEUCINA		PROLINA		TIOROSINA	
	Cre	E	Cre	E	Cre	E	Cre	E	Cre	E	Cre	E	Cre	E	Cre	E	Cre	E
BA-1	++	-	-	-	-	-	++	-	++	-	+++	-	++	-	+++	-	++	-
BA-2	++	-	-	-	-	-	++	-	++	-	+++	-	++	-	+++	-	++	-
BA-9	++	-	-	-	-	-	+	-	++	-	+++	-	++	-	+++	-	++	-
BA-13	++	-	-	-	-	-	++	-	++	-	+++	-	++	-	+++	-	++	-
BA-15	++	-	-	-	-	-	++	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-
<b>BA-18</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	-	-	-	-	<b>++</b>	<b>+++</b>	<b>+++</b>	<b>+</b>	<b>+++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>+++</b>	-
<b>BD-1</b>	<b>++</b>	-	-	-	-	-	<b>++</b>	-	<b>+</b>	-	<b>+++</b>	-	<b>++</b>	-	<b>+++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	-
BD-3	++	min	-	-	-	-	++	+	+	-	+	-	+++	-	+++	++	++	-
BL-1	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	min	+	+	-	++	+	++	+
BL-3	++	-	-	-	-	-	++	-	++	-	+++	-	++	-	+++	-	++	-
BL-4	++	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+++	-	+	-	+++	-	+	-
BL-6	+	-	-	-	-	-	+	-	++	-	+++	-	+	-	++	-	++	-
BL-8	++	-	-	-	-	-	+	-	++	-	+++	-	++	-	+++	-	++	-
BL-9	min	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	min	-	min	-	min	-
BL-10	++	-	-	-	-	-	++	-	++	-	++	-	++	-	+++	-	++	-
BL-12	++	-	-	-	-	-	+	-	+++	-	++	-	+++	-	+++	-	++	+
CV-4	+++	-	-	-	-	-	+	+	++	-	++	++	++	+	+++	+	++	-
CV-5	+++	-	-	-	-	-	++	-	++	-	+++	-	++	-	+++	-	++	-
CV-7	++	-	-	-	-	-	++	-	++	-	++	-	++	-	+++	-	+	-
<b>CV-11</b>	<b>+++</b>	<b>+</b>	-	-	-	-	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>+++</b>	<b>+++</b>	<b>+++</b>	<b>+</b>
CV-13	++	-	-	-	-	-	++	-	++	-	+++	-	++	-	+++	-	+++	-
CV-20	++	-	-	-	-	-	++	-	++	-	++	-	++	-	+++	-	++	-
DU-2	++	-	-	-	-	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	+
DU-4	++	-	-	-	-	-	++	-	++	-	++	-	++	-	+++	-	++	+
DU-6	++	-	-	-	-	-	++	-	++	-	++	-	++	-	+++	-	++	-
DU-11	++	+	-	-	-	-	++	+	+++	+	++	+	++	+	+++	++	++	+
DU-12	++	-	-	-	-	-	++	-	++	-	+++	-	++	-	+++	-	++	-
DX-9	++	-	-	-	-	-	++	-	++	-	+++	-	+	-	++	-	+++	+
DX-12	++	-	-	-	-	-	++	-	++	-	++	-	++	-	+++	-	+++	-

AISLADO	ADENINA		VALINA		TRIPTOFANO		METIONINA		ARGININA		HISTIDINA	
	Cre	E	Cre	E	Cre	E	Cre	E	Cre	E	Cre	E
BA-1	-	-	+	-	++	+	+++	+	+	-	-	-
BA-2	-	-	+	-	+	-	++	-	++	-	-	-
BA-9	-	-	+	-	++	-	++	-	+	-	-	-
BA-13	-	-	+	-	-	-	+++	+	+	-	-	-
BA-15	-	-	++	-	++	+	+++	-	+	-	-	-
<b>BA-18</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>++</b>	<b>+++</b>	<b>++</b>	<b>-</b>	<b>+++</b>	<b>+++</b>	<b>+++</b>	<b>+</b>	<b>+++</b>	<b>+++</b>
<b>BD-1</b>	<b>++</b>	<b>-</b>	<b>++</b>	<b>-</b>	<b>++</b>	<b>-</b>	<b>+++</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
BD-3	-	-	+	+	+	+	+++	+	+	+	+	+
BL-1	-	-	+	+	min	+	+++	+++	min	-	-	-
BL-3	-	-	+	-	++	-	++	+	+	-	-	-
BL-4	-	-	+	-	++	-	++	-	+	-	-	-
BL-6	-	-	+	-	++	-	++	+	+	-	-	-
BL-8	-	-	+	-	++	-	++	-	+	-	-	-
BL-9	-	-	min	-	min	-	+++	+++	min	-	-	-
BL-10	-	-	+	-	++	-	++	-	min	-	-	-
BL-12	min	-	+	-	++	-	++	-	+	-	-	-
CV-4	min	-	+	-	++	-	++	++	+	-	-	-
CV-5	+	-	+	-	++	-	++	+	+	-	-	-
CV-7	min	-	+	-	++	-	++	-	+	-	-	-
<b>CV-11</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>SR</b>	<b>SR</b>	<b>++</b>	<b>+++c</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+++</b>	<b>+</b>
CV-13	-	-	+	-	SR	SR	++	+	+	min	-	-
CV-20	min	-	+	-	SR	SR	++	-	+	-	-	-
DU-2	-	-	+	-	SR	SR	++	-	+	-	min	-
DU-4	min	-	+	-	SR	SR	+	-	+	-	+	-
DU-6	-	-	+	-	SR	SR	+	-	-	-	-	-
DU-11	min	+	+	+	SR	SR	++	++	+	+	-	-
DU-12	-	-	+	-	++	-	++	-	+	-	-	-
DX-9	min	-	+	-	++	-	++	++	+	-	-	-
DX-12	-	-	+	-	+++	+	++	-	++	+	-	-

Simbología: (Cre), crecimiento; (E), esporulación; (+), crecimiento positivo; (-), crecimiento negativo; (min), mínimo; (SR), sin resultados

## **7. DISCUSIÓN.**

### **7.1 Aislados microbianos**

El mejor crecimiento de los 30 aislados del Golfo de California con los que se trabajó en el presente trabajo fue en GYM. Las características generales de los aislados a lo largo de la incubación fue la formación de una colonia de color naranja de consistencia seca y rugosa la cual se fue tornando de color negra y consistencia mucoides debido al proceso de esporulación que caracteriza al género (Suarez & Hardisson, 1985). Sin embargo, no todos los aislados presentaron dicha característica, ya que no se ha descrito con exactitud el ciclo de vida de este género. En algunos aislados la esporulación fue completa en la colonia y en otros aislados solo se dio en ciertas secciones de la colonia así como la coloración de las esporas que varía entre un color negro brillante, algunas tomando un color gris y en otros casos presentaban una coloración café.

La mayoría de los aislados presentaron una morfología muy similar entre sí, pero cada aislado presentó su propia característica particular como el color de la spora o de la colonia y la formación de micelio aéreo. que lo distingue entre los otros aislados y por lo cual se puede suponer que se trata de especies diferentes, pero esto no se puede asegurar hasta no hacer un estudio genotípico en cada uno de los aislados e identificar a que especie pudieran pertenecer. Estas características individuales se hacen más notables en las diferentes caracterizaciones fenotípicas que se realizaron en este trabajo y que se describen más adelante.

### **7.2 Caracterización en GYM/marino.**

La caracterización en el medio GYM/marino es indispensable ya que en este trabajo se utilizaron bacterias de origen marino, y al tener un medio con las condiciones más parecidas a su hábitat natural, sus características morfológicas son las más cercanas a como el microorganismo se encuentra en su medio aunque hagan falta otras condiciones a considerar, por ejemplo la presión. Las diferencias que se presentaron entre este medio y el medio GYM son muy pocas; la diferencia más notable es el crecimiento de los aislados y la razón de por qué no ocupó en

este trabajo el medio GYM/marino como medio control, fue porque el crecimiento fue menor que en el medio GYM.

Otras de las diferencias que se presentaron entre el medio GYM y el medio GYM/marino fue el proceso de esporulación de los aislados, donde en algunos aislados en donde se presentó esporulación ya no la hubo y viceversa, y en otros casos la esporulación se presentó en menor cantidad. Cabe mencionar que todos los aislados tienen una tolerancia al NaCl a un valor aproximadamente de 3.5% que es la concentración de sal del ambiente marino y esto es factible ya que se sabe que la mayoría de las especies de este género son aislado de muestras de origen marino, aunque no se consideran dependientes de SM o NaCl (Maldonado *et. al.*, 2005b).

### **7.3 Caracterización en diferentes concentraciones de NaCl y SM**

En el presente trabajo se trabajó con 2 concentraciones diferentes de NaCl y SM, 1% y 2% de cada sal, las cuales se incorporaron en 4 medios de cultivo diferentes (GYM, YEME, GYEA y OA), esto con la finalidad de observar su crecimiento así como sus características macro- y microscópicas de los aislados. Los aislados presentaron una tolerancia del 3.5% de sales que es la concentración en el ambiente marino, pero esto no necesariamente significa que para el crecimiento de los aislados sea necesario que en los diferentes medios de cultivo se deban suplementar con algún tipo de sal.

Entre los resultados más importantes que se presentaron en esta caracterización fue la presencia de micelio aéreo en 4 de los aislados en diferentes medios y condiciones (apéndice C), esta característica aparentemente es poco común dentro del género *Micromonospora* pero se sabe que en algunos cultivos desarrollan una hifa aérea corta y estéril. Una de las especies que presentan ésta característica es *Micromonospora echinospora*, que además es el productor de gentamicina por lo que aquellos aislados que produjeron micelio aéreo tal vez podrían estar sintetizando compuestos bioactivos de interés.

De las especies que produjeron micelio aéreo 3 de ellas lo presentaron en medio GYM al 1% de NaCl y SM, una de las características de este medio es que en su composición se encuentra el carbonato de calcio al 2% y reportes sugieren que además de que el carbonato de calcio es un compuesto traza para el aislamiento selectivo de actinobacterias induce la producción de metabolitos secundarios, micelio aéreo y esporulación en miembros del género *Streptomyces* (Moncheva *et. al.*,2000; Gohar & El-Naggar, 2001); pero esto no explica por completo la producción de micelio aéreo en este trabajo ya que esta característica sólo se presentó en presencia de sales. Si se observan los resultados con cuidado, el micelio aéreo no se presentó en el medio GYM sin ningún complemento. Otra situación en particular que podemos describir es que la producción del micelio aéreo de los aislados se dio mejor en medios complementados con SM ya que se observó tanto al 1 como al 2% de concentración lo que no ocurrió con NaCl que solo se observó al 1% de concentración. Curiosamente la SM acercaría mas las condiciones a las que se encuentran los microorganismos de estudio en su hábitat natural que solamente agregar NaCl.

En el aislado BL-1 la producción de micelio aéreo se dio en presencia de esporulación, y en estudios previos se reporta que el micelio aéreo es una estructura infértil (es decir, “libre de esporas”). Sin embargo, no describen si se produce antes o después de la esporulación, y por ejemplo en casos como en los aislados BL-4 y CV-4 donde la producción de micelio aéreo se llevó a cabo sin la presencia de esporulación nos podría indicar que es antes, aunque esto no se podría confirmar en su totalidad ya que depende de las características particulares del microorganismo así como las condiciones del medio para la producción de micelio aéreo y de llevar a cabo el proceso de esporulación. Existen 4 especies válidamente descritas que tienen la capacidad para producir micelio aéreo, pero solo una de ellas específica en que medio lo produce y es en agar inorgánico Gause y agar Sauton's (Huang *et. al.*, 2008).

#### **7.4 Caracterización fenotípica en diferentes fuentes de Carbono.**

Ninguno de los 30 aislados presentó crecimiento en sorbitol, xilitol, adonitol e inositol que son de tipo polialcohol, así como en glicerol de tipo alcohol y ácido málonico de tipo de ácido dicarboxílico. Lo anterior puede sugerir que los aislados muestran dificultad para crecer en fuentes que contengan moléculas de alcohol.

El crecimiento de los aislados en las diferentes fuentes de carbono en general fue muy pobre y muy heterogéneo como se reportó en la tabla 12 (apéndice C). El aislado que obtuvo un mejor crecimiento fue el BD-3, que de las 25 fuentes utilizadas creció en 15 de las cuales en 9 presentó esporulación lo que nos indica su gran capacidad de este aislado para utilizar diversas fuentes de carbono, así mismo hubo 8 aislados que no crecieron en ninguna fuente de carbono y esto es muy peculiar ya que al parecer no son capaces utilizar ninguna de las fuentes de carbono utilizadas en este trabajo.

En la literatura se encuentra descrito que las fuentes de carbono utilizadas por la mayoría de las especies son glucosa, maltosa, sacarosa y almidón, aunque algunas otras también pueden utilizar xilosa, celobiosa, manosa y trahalosa y no crecen o tienen un crecimiento mínimo en sorbitol, sorbosa y melezitosa (Goodfellow *et. al.*, 1984)

En resumen el crecimiento en las diferentes fuentes de carbono fue escaso y heterogéneo en la mayoría de los aislados, pero esto nos puede ayudar a desarrollar medios de cultivo específicos para cada uno de los aislados y así poder seleccionarlos e identificarlos por especie y poder compararlos con las especies descritas.



## 7.5 Caracterización fenotípica en diferentes fuentes de Nitrógeno

El crecimiento de los aislados en las diferentes fuentes de nitrógeno fue homogéneo en la mayoría de estas a comparación del crecimiento que se presentó en las diferentes fuentes de carbono.

El mejor crecimiento que presentaron la mayoría de los aislados fue en los medios adicionados con las fuentes de fenilalanina, ornitina, alanina y prolina donde se observan que las características morfológicas (figura 12) corresponden a las características generales del género *Micromonospora*; en otras fuentes como alanina, triptófano, metionona, arginina, etc. si se presentó crecimiento pero no con tanta intensidad y mostrando características diferentes a las generales, por ejemplo en el color, y la textura colonial. Hablando del ciclo de esporulación pocos fueron los aislados que presentaron esta característica, uno de los aislados que mayor esporulación tuvo en las diferentes fuentes de nitrógeno fue el BA-18 que presentó esporas en 7 de las 15 fuentes utilizadas.

Una de los resultados que sobresalen es el presentado por el aislado BL-9 que presentó un crecimiento en 8 de 15 fuentes de los cuales 6 fue un crecimiento mínimo y los otros 2 un crecimiento regular, pero en metionina presentó esporulación. De los demás aislados el crecimiento fue muy homogéneo.

Ninguno de los 30 aislados presentaron crecimiento de colonias en el medio adicionado con las fuentes de ácido aspártico y ácido glutámico, esto está ligado con el resultado obtenido en fuentes de carbono donde no se presentó crecimiento de ningún aislado en el medio adicionado con ácido malónico, ya que estos tres compuestos comparten un grupo funcional en común que aparentemente no puede ser empleado por estos microorganismos.

Fue imposible hacer una comparación de las fuentes utilizadas por los microorganismos de estudio y las especies de *Micromonospora* válidamente

descritas, debido a la heterogeneidad de las pruebas realizadas en los diferentes grupos de investigación que estudian este género y que han sido publicados.

En resumen los microorganismos aislados del Golfo de California correspondientes al género *Micromonospora* presentan una amplia capacidad para utilizar distintas fuentes de nitrógeno sin observarse una tendencia que permitiese su diferenciación o separación, dado por la homogeneidad.

## 8. CONCLUSIONES

- El presente trabajo representa parte importante de la primera línea de investigación sobre *Actinobacterias* del género *Micromonospora* de origen marino, aislados del Golfo de California.
- Los 30 aislados evaluados en este trabajo presentaron su mejor crecimiento en medio GYM el cuál se empleó como el medio de cultivo control para describir las características macroscópicas de los aislados. Esto fue posible por medio de las evaluaciones realizadas.
- La evaluación de los aislados en medio GYM/marino nos da una perspectiva de cómo se presentan estos microorganismos en su ambiente natural, y como pudieran estar respondiendo a condiciones de estrés.
- La evaluación fenotípica en presencia de NaCl y sales marinas arrojó resultados importantes, entre ellos la producción de micelio aéreo en 4 de los aislados (BL-1, BL4, BL-9 y CV-4), condición fisiológica poco descrita en especies del Género *Micromonospora*.
- La utilización de diferentes fuentes de nitrógeno fue muy similar entre los aislados, lo cual no permite que esta prueba pueda utilizarse para diferenciar a los aislados.
- Respecto a la utilización de fuentes de carbono el crecimiento fue más variado, lo que nos podría permitir desarrollar algún medio de cultivo selectiva para algunos aislados en particular.
- El estudio de microorganismos de origen marino, en especial del género *Micromonospora* y su caracterización fenotípica, representa un avance importante dentro de la microbiología

## 9. PERSPECTIVAS.

- ❖ Realizar estudios que profundicen en el ciclo de vida del género *Micromonospora* ya que a la fecha no existen reportes claros sobre dicho proceso, además de no conocerse la función e importancia del micelio aéreo dentro de este grupo de microorganismos.
- ❖ Realizar una caracterización más extensa tanto fenotípica como genotípicamente empleando herramientas de biología molecular a los 30 aislados de este trabajo; pero sobre todo con énfasis en aquellos que formaron micelio aéreo.
- ❖ Dado que se sabe que *Micromonospora echinospora* es productora de un la gentamicina sería interesante hacer estudios a estos aislados que nos puedan arrojar algunos resultados interesantes sobre la producción de metabolitos que puedan utilizarse en la industria farmacéutica.
- ❖ Es claro que investigaciones como la que aquí se presenta podrían ser una prioridad en México, pues al ser México un país megadiverso y por lo tanto una fuente de nuevos microorganismos, éstos deberían ser estudiados en áreas como microbiología marina y molecular. La oportunidad para su aplicación en la investigación en México resultaría un tema inagotable de estudio de vanguardia.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Bérdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites: a personal view. *J. Antibiot.* 58, 1-26.
2. Bredholt, H., Fjaervik, E., Johnsen, G., Zotcher, S. B. 2008. *Actinomycetes* from sediments in the Tronheilm Fjord, Norway: Diversity and Biological Activity. *Mar. Drugs.* 6, 12-24.
3. Bull, A., Ward, A. C., Goodfellow, M. 2000. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64, 573-606.
4. Carro, L., Pukall, R., Sproer, C., Kruppenstedt, R. M., Trujillo, M. E. 2012. *Micromonospora cremea* sp. Nov., isolated from the rhizosphaera of *Pisum sativum* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. Doi:10.1099/ijs.0.038695-0.
5. Feling, R. H., Buchanan, G. O., Mincer, T. J., Kauffman, C. A., Jensen, P. R., Fenical, W. 2003. Salinospormide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. *Angew Chem. Int Ed.* 42, 355-357.
6. Gohar, Y. M., & El-Naggar M. 2001. Induction of sporulation and antibacterial activity in the aerial mycelium negative mutants of *Streptomyces nasri*. *Egypt. J. Biol.* 3, 2-35.
7. Gontang, E.A., Fenical, W. & Jensen, P. 2007. Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *A. & E. Microbiol.* 71,3272-3282.
8. Goodfellow M. & Haynes J. A. 1984. Actinomycetes in marine sediments. In: Ortiz-Ortiz L., Bojalil L.F. and Yakoleff V. (eds), Biological, biochemical and biomedical aspects of actinomycetes. Academic Press, Orlando, 453-472 pp.
9. Goodfellow, M. & Fiedler H. P. 2010. A guide to successful bioprospecting: Informed by actinobacterial systematics. *Antonie van Leeuwenhoek.* 98, 119-142.
10. Goodfellow, M., Mordarski, M., & Williams, S.T. (1984). The Biology of the Actinomycetes. Academic Press. 14-17. Pp.
11. Hirsch, A. M., Valdés, M. 2009. *Micromonospora*: An important microbe for biomedicine and potentially for

biocontrol and biofuels. *Soil Biol. & Biochem.* Doi: 10.1016/j. soilbio. 2009.11.023.

12. Holt, J.G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. a., Staley, J. T., Williams, S. T., 2000. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, ninth ed. Lippencott, Williams & Wilkins, 653-655.
13. Horan, A. C. & Brodsky, B. C. 1986. *Micromonospora rosaria* sp. Nov., no. Rev., the rosaramicin producer. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30, 565-568.
14. Huang, H., Jiasen, L., Yonghua, H., Zhe, F., Kaishan, Z., Shixiang, B. 2008. *Micromonospora rifamycinica* sp. Nv., a novel actinomycete from mangrove sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58,17-20.
15. Hunter-Cevera J. C. 1998. The value of microbial diversity. *Current Opinion in Microbiology.* 1,278-285.
16. Imada, C., Koseki, N., Kamata, M., Kobayashi, T., Hamada-Sato, N. 2007. Isolation and characterization of antibacterial substances produced by marine actinomycetes in the presence of seawater. *Actinomycetologica.* 21, 27.31.
17. Jensen, R. R., Mincer, T. G., Williams, G. P., Fenical, W. 2005. Marineas actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie van Leeuwenhoek.* 87, 43-48.
18. Juarez, J. & Hardisson, C. 1985. Morphological Characteristics of Colony Development in *Micromonospora Chalcea*. *J. Bacteriol.* 162, 1342-1344.
19. Kennish J. M. 2001. *Practical handbook of marine science.* CRC Press. New Jersey, USA. 441-444 pp.
20. Kroppenstedt, RM., Mayilraj, S., Wink, J., Kallow, W., Schumann, P., Secondini, Ch & Stackebrandt, E. 2005. Eight new species of the genus *Micromonospora*, *Syst. And Appl. Microbiol.* 28, 328-329
21. Labeda, D.P. 1987. Actinomycete taxonomy: generic characterization. *Developments in Industrial Microbiology. J. I. Biol.* 28,115–121.
22. Logan, N.A. 1994. *Bacterial Systematics.* Blackwell Scientific Publications, Oxford, 272 pp.

23. Luedemann, G. M. & Brodsky, B. C. 1965. *Micromonospora carbonaceae* sp.n., an everninomicin producing organism. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 80, 47-52.
24. Madigan M. T. & Martinko J. M. 2006. *Brock Biology of microorganisms*. 11<sup>th</sup> Ed. Pearson Prentice Hall, USA.
25. Magarvey N. A, Keller J. M., Bernan V., Dworkin M. & Sherman D. H. 2004. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *A. & E. Microbiol.* 70,7520-7529.
26. 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*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55,1759-1766.
27. Maldonado L. A., Stach J. E., Pathomaree 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.
28. 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.
29. Mincer T. J., Jensen P. R., Kauffman C. A. & Fenical W. 2002. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *A. & E. Microbiol.* 68,5005-5011.
30. Moncheva, P. A., Danova, S. T., Gocheva, I. A., Ivanova, I. V. 2000. Calcium ions and the differentiation of *Streptomyces hygroscopicus* 155, a producer of an antibiotic complex. *Antibiot. Khimioter.* 45, 10-14.
31. Prescott, M.L., Harley, P.J. y Klein, A.D. 1999. *Microbiología*. Mc Graw Hill Interamericana.
32. Shirling, E.B. y Gottlieb, D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *I. J. Syst. Bacteriol.* 16, 313-40

33. Sneath, P.H.A. 1957. Some thoughts on bacterial classification. *J. Gen. Microbiol.* 17,184-200.
34. Sogin M. L., Morrison H. G., Huber J. A., Welch D. M., Huse S. M., Neal P. R., Arrieta J. M. & Herndl G. J. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 32,12115-12120.
35. Stach J.E.M, Maldonado L.A., Masson D.G., Ward A.C., Goodfellow M. & Bull A.T. 2003. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. *A. & E. Microbiol.* 69, 6189-6200.
36. Stackebrandt E., Rainey F. A., & Ward-Rainey N. L. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. I. *J. Syst. Bacteriol.* 47,479-491.
37. Staneck, J.L. y Roberts, G.D. 1974. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *A. Microbiol* 28,226-231.
38. Suarez, J. & Hardisson, C. 1985. Morphological Characteristics of Colony Development in *Micromonospora chalcea*. *J Bacteriol.* 162, 1342-1344.
39. Tomita, K. Hshino, Y., Ohkusha, N., Tsuno, T., Miyaki, T. 1992. *Micromonospora chersina* sp. Nov. *Actinomycetologica.* 6, 21-28.
40. Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald F. G., Chater, K. F. van Sinderen, D. 2007. Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 495-548.
41. Ward A. C. & Bora N. 2006. Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Current Opinion in Microbiology.* 9,1-8.
42. Xie, Q.Y., Qu, Z., Lin, H. P., Li, L., Hong, K. 2012. *Micromonospora haikouensis* sp. Nov., isolated from mangrove soil. *Antonie van Leeuwenhoek.* 101,649-655.



## 11. APENDICES

### 11.1) A: Medios de Cultivo

Todos los medios de cultivo se prepararon con agua bidestilada excepto GYM marino que se preparó con agua marina y fueron esterilizados en autoclave a 121°C por 15 minutos a 15 lb de presión.

<b>GYM</b> (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 bidestilada	1000 mL
pH 7.0-7.2	

NOTA: GYM marino, utilizar agua marina artificial (Instant Ocean, USA)

<b>Agua marina</b>	
Sales marinas	35g
Agua destilada	1000 mL

<b>YEME</b> (Shirling & Gottlieb, 1966)	
Glucosa	10 g
Extracto de levadura	3 g
Extracto de malta	3 g
Bacto peptona	5 g
Agar	12 g
Agua bidestilada	1000 mL
pH 7.0-7.2	

<b>GYEA</b> (Agar Glucosa extracto de Levadura; Gordon & Mihm, 1962)	
Glucosa	10 g
Extracto de Levadura	10 g
Agar	12 g
Agua bidestilada	1000 mL
pH 7.2	

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

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

AO (agar avena)	
Avena (hojuelas)	20 g
Agua bidestilada	1000 mL
agar	12 g
pH 7-7.2	

NOTA: Calienta por 30 min con agitación, se cuela la mezcla y se repone el volumen perdido, se le adiciona 1 mL de solución traza (apéndice B) y se ajusta el pH.

## 11.2) B: Amortiguadores y Soluciones

Todos los amortiguadores y soluciones fueron preparados con agua bidestilada y fueron esterilizados en autoclave a 121°C por 15 minutos a una presión de 15 lb.

SSI 0.9% NaCl	
Cloruro de Sodio	9.0 g
Agua bidestilada	1000 mL

Solución Traza (Pridham & Gottlielo trace salt)	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.64 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.11 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.79 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.15 g
Agua bidestilada	1000 mL

### 11.3) C: Tablas de Resultados

**Tabla 8:** Crecimiento de los aislados en medio GYM (1% y 2% NaCl y SM)

AISLADO	GYM			GYM 1% NaCl			GYM 2% NaCl			GYM 1% SM			GYM 2% SM		
	Cre	E	MA	Cre	E	MA	Cre	E	MA	Cre	E	MA	Cre	E	MA
BA-1	+++	-	-	+++	min	-	++	-	-	+++	++	-	++	+	-
BA-2	+++	min	-	++	-	-	+	-	-	++	+	-	+	-	-
BA-9	+++	+	-	+++	min	-	+	-	-	+++	++	-	++	++	-
BA-13	+++	-	-	+++	-	-	++	-	-	+++	-	-	++	Min	-
BA-15	+++	++	-	+++	-	-	+	-	-	++	+++	-	+	++	-
BA-18	+++	+++	-	++	+++	-	+	++	-	++	+++	-	++	+++c	-
BD-1	+++	+++	-	+++	++	-	+	-	-	++	+++	-	++	++	-
BD-3	++	+++ m	-	+++	+	-	+	-	-	+++	+	-	++	+	-
<b>BL-1</b>	<b>+++</b>	<b>+++</b>	<b>+</b>	<b>+++</b>	<b>+++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>-</b>	<b>+++</b>	<b>++</b>	<b>+++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>
BL-3	+++	-	-	+++	-	-	+	-	-	+++	min	-	++	-	-
BL-4	+++	-	-	+++	-	-	+	-	-	+++	-	-	++	-	-
BL-6	+++	-	-	++	-	-	+	-	-	++	min	-	+	min	-
BL-8	+++	-	-	++	-	-	++	-	-	+++	+	-	++	++	-
<b>BL-9</b>	<b>+++</b>	<b>+++</b>	<b>-</b>	<b>+++</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
BL-10	+++	min	-	++	-	-	+	-	-	++	+	-	++	++	-
BL-12	+++	-	-	++	+	-	+	-	-	+++	-	-	++	+	-
<b>CV-4</b>	<b>+++</b>	<b>++</b>	<b>-</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>++</b>	<b>+++</b>	<b>-</b>	<b>++</b>	<b>+++</b>	<b>-</b>
CV-5	+++	-	-	+	-	-	+	-	-	++	-	-	+	-	-
CV-7	++	+	-	+++	min	-	++	-	-	++	++	-	++	++	-
CV-11	++	+	-	++	++	-	+	++	-	++	++	-	++	min	-
CV-13	+++	+	-	++	-	-	+	-	-	++	++	-	+	-	-
CV-20	+++	min	-	++	-	-	+	-	-	+++	-	-	+	-	-
DU-2	+++	+++m	-	++	+	-	+	-	-	++	+++	-	+	++	-
DU-4	+++	++	-	++	++	-	+	-	-	++	+++	-	++	++	-
DU-6	++	+	-	+	-	-	+	-	-	++	++	-	+	+	-
DU-10	++	-	-	++	-	-	++	-	-	+++	min	-	++	-	-
DU-11	+++	+++	-	++	++	-	+	-	-	++	++	-	++	+++	-
DU-12	+++	++	-	++	-	-	+	-	-	++	+++	-	++	+	-
DX-9	+++	++	-	++	+++	-	+	+	-	++	+++	-	++	+++	-
DX-12	+++	+++	-	++	+	-	++	-	-	++	+++	-	++	+++	-

**Tabla 9:** crecimiento de los aislados en medio YEME (1% y 2% de NaCl y SM)

AISLADO	YEME			YEME 1% NaCl			YEME 2% NaCl			YEME 1% SM			YEME 2% SM		
	Cre	E	MA	Cre	E	MA	Cre	E	MA	Cre	E	MA	Cre	E	MA
BA-1	+++	-	-	+	-	-	+	-	-	+++	min	-	++	-	-
BA-2	+++	-	-	+	-	-	-	-	-	+++	+++	-	++	+	-
BA-9	+++	+	-	+	-	-	min	-	-	++	++	-	++	-	-
BA-13	+++	-	-	+	-	-	+	-	-	+++	-	-	++	-	-
BA-15	+++	++	-	+	-	-	min	-	-	++	++	-	+	+	-
BA-18	+++	+++	-	++	++	-	++	+++	-	++	+	-	+	+++m	-
BD-1	+++	+++m	-	++	+	-	min	-	-	+++	++	-	+	+	-
BD-3	+++	+++	-	+	-	-	+	-	-	++	++	-	++	+	-
<b>BL-1</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>++</b>	<b>+++</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>+++</b>	<b>-</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>
BL-3	+++	-	-	+	-	-	+	-	-	+++	-	-	++	min	-
BL-4	+++	-	-	+	-	-	min	-	-	++	-	-	++	-	-
BL-6	+++	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	++	-	-
BL-8	+++	-	-	+	-	-	+	-	-	+++	-	-	++	-	-
BL-9	+++	++	-	++	++	-	++	+++	-	+++	++	+	++	++	+
BL-10	++	-	-	+	-	-	-	-	-	+++	+	-	++	-	-
BL-12	+++	-	-	+	-	-	+	-	-	++	-	-	++	-	-
CV-4	++	+++	-	+	-	-	min	-	-	++	+++	-	+	++	-
CV-5	+++	-	-	+	-	-	+	-	-	++	-	-	++	-	-
CV-7	+++	+	-	+	-	-	+	-	-	++	+	-	+	+	-
CV-11	+	+m	-	+	++	-	++	++	-	+	+m	-	++	+	-
CV-13	+++	min	-	+	-	-	+	-	-	+	+c	-	+	-	-
CV-20	++	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
DU-2	++	+++	-	+	-	-	-	-	-	++	+++	-	++	++	-
DU-4	+++	+++	-	+	-	-	-	-	-	++	++	-	++	++	-
DU-6	++	+	-	min	-	-	-	-	-	+	min	-	+	-	-
DU-10	+++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	-	-	-
DU-11	+++	+++	-	+	-	-	+	-	-	++	++	-	+	++	-
DU-12	+++	+	-	+	-	-	+	-	-	++	+	-	++	+	-
DX-9	+++	++	-	+	-	-	+	-	-	++	++	-	+	+	-
DX-12	+++	++	-	+	-	-	+	-	-	++	++	-	++	+	-

**Tabla 10:** crecimiento de los aislados en medio GYEA (1% y 2% de NaCl y SM)

AISLADO	GYEA			GYEA 1% NaCl			GYEA 2% NaCl			GYEA 1% SM			GYEA 2% SM		
	Cre	E	MA	Cre	E	MA	Cre	E	MA	Cre	E	MA	Cre	E	MA
BA-1	++	+	-	+	-	-	+	-	-	+++	++	-	++	-	-
BA-2	++	-	-	+	-	-	min	-	-	++	-	-	+	-	-
BA-9	++	+/-	-	+	-	-	+	-	-	++	+	-	+	+	-
BA-13	++	-	-	++	-	-	+	-	-	++	-	-	++	-	-
BA-15	++	++	-	+	-	-	min	-	-	++	++	-	+	+	-
BA-18	++	+++	-	++	++	-	++	+++	-	++	++	-	++	+++	-
BD-1	++	+	-	+	-	-	+	-	-	++	+/-	-	++	+++	-
BD-3	++	+++	-	+	-	-	+	+	-	++	++	-	++	++	-
<b>BL-1</b>	<b>++</b>	<b>+m</b>	-	<b>++</b>	<b>++</b>	-	<b>+</b>	<b>++</b>	-	<b>++</b>	<b>++</b>	-	<b>+</b>	<b>++</b>	-
BL-3	++	-	-	+	-	-	+	-	-	++	-	-	++	-	-
BL-4	++	-	-	+	-	-	min	-	-	++	-	-	++	-	-
BL-6	++	-	-	++	-	-	+	-	-	++	-	-	++	-	-
BL-8	++	-	-	+	-	-	+	-	-	++	-	-	++	-	-
BL-9	++	+	-	+	-	-	++	+	-	++	+	-	++	+/-	-
BL-10	++	-	-	+	-	-	min	-	-	++	+	-	+	-	-
BL-12	+	-	-	+	-	-	+	-	-	++	-	-	++	-	-
CV-4	++	++	-	+	-	-	+	-	-	++	+++	-	+	++	-
CV-5	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
CV-7	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	++	-	+	++	-
CV-11	+	+	-	++	+++	-	++	+++	-	+	++	-	+	+++c	-
CV-13	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
CV-20	+	-	-	+	-	-	min			+	-	-	+	-	-
DU-2	++	++	-	+	+	-	+	-	-	++	++	-	+	++	-
DU-4	++	+	-	+	-	-	min			++	+++	-	++	+++	-
DU-6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
DU-10	++	-	-	+++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-
DU-11	++	++	-	+	-	-	min	-	-	++	++	-	++	++	-
DU-12	++	+	-	+	-	-	+	-	-	++	++	-	++	++	-
DX-9	+	++	-	+	-	-	+	-	-	++	++	-	++	++	-
DX-12	++	++	-	+	-	-	+	-	-	++	++	-	++	+++	-





**Tabla 12:** Crecimiento de los aislados en las diferentes fuentes de Carbono.
















































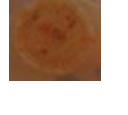













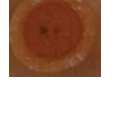


AISLADO	MANOSA		MELOBIOSA		MELIZITOSA		INOSITOL		LACTOSA		MALTOSA		GALACTOSA		GLICEROL		GLUCOSA		CELULOSA		CELOBIOSA		FRUCTOSA		
	Cre	E	Cre	E	Cre	E	Cre	E	Cre	E	Cre	E	Cre	E	Cre	E	Cre	E	Cre	E	Cre	E	Cre	E	
BA-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BA-2	-	-	++	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	++	-	-	-	++	-	+	-	-
BA-9	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	++	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
BA-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BA-15	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
BA-18	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	++	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+++	-	-	-	-
BD-1	+	+	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	++	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
BD-3	+++	++	-	-	+++	-	-	-	+++	++	+++	++	+++	-	-	-	++	+	+	++	++	-	-	-	-
BL-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BL-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BL-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BL-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BL-8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BL-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BL-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
BL-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CV-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CV-5	-	-	++	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CV-7	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CV-13	-	-	+++	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	++	min	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-
CV-20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DU-2	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DU-4	-	-	+	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	+	-	-
DU-6	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DU-10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
DU-11	++	-	+++	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
DU-12	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DX-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DX-12	+++	-	++	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
































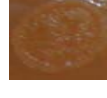





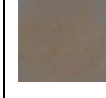













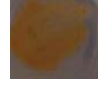




















Ac. MAL		ADONITOL		ARABINOSA		SUCROSA		RAMNOSA		RAFINOSA		MANITOL		ALMIDON		XILOSA		TREHALOSA		SORBOSA		SORBITOL		XILITOL	
Cre	E	Cre	E	Cre	E	Cre	E	Cre	E	Cre	E	Cre	E	Cre	E	Cre	E	Cre	E	Cre	E	Cre	E	Cre	E
-	-	-	-	min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
-	-	-	-	min	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
-	-	-	-	min	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	++	-	+	-	+	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	+	-	-	-	+	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	+++	+	-	-	+	+	++	-	++	-	+++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	++	+	++	+	++	-	+++	-	+	+	+	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	++	-	++	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	min	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	+++	+	++	-	+++	-	+++	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	++	+	+	+	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	++	+	++	-	+++	+	+++	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	++	-	+++	-	+	-	+++	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-

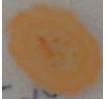












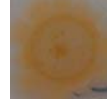






















































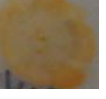
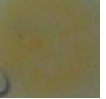

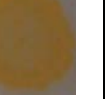

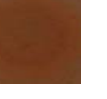










Simbología: (Cre), crecimiento; (E), esporulación; (+), crecimiento positivo; (-), crecimiento negativo; (min), mínimo.






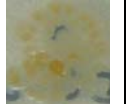













































#### 11.4) D: Fuentes de Nitrógeno.

Figura 13: Ejemplificación del crecimiento de los aislados en diferentes fuentes de nitrógeno.

AIS	PHE	ORN	ALA	VAL	TRY	MET	ARG	SER	ISO	PRO	TYR
BA-1											
BA-2											
BA-9											
BA-13					-						
BA-15								SF	SF	SF	SF
BA-18								SF	SF	SF	SF
BD-1								SF	SF	SF	SF

BD-3								SF	SF		SF
BL-1					min		min	min			
BL-3											
BL-4											
BL-6											
BL-8											
BL-9	Min	-		Min	min		min	-	min	min	min
BL-10							min				

BL-12											
CV-4											
CV-5											
CV-7											
CV-11					ND						
CV-13					ND						
CV-20					ND						
DU-2					ND						

DU-4					ND						
DU-6					ND		-				
DU-11					ND						
DU-12											
DX-9											
DX-12	