



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA  
MICROBIOLOGÍA

ACTINOBACTERIAS CULTIVABLES  
EN LA LAGUNA DE TÉRMINOS, CAMPECHE, MÉXICO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:  
LAURA NATALY RIVERA GARCÍA

TUTOR PRINCIPAL  
Dra. María Leticia Arena Ortiz, SISAL

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dr. Bruno Gómez-Gil Rodríguez Sala, CIAD Mazatlán.  
Dr. Miroslav Macek, FES Iztacala.  
Dra. Patricia Bonilla Lemus, FES Iztacala.  
Dra. Gloria Vilaclara Fatjó, ICMYL.

MÉXICO, D. F. JULIO 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



*Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología*  
Universidad Nacional Autónoma de México



**ACTINOBACTERIAS CULTIVABLES  
EN LA LAGUNA DE TÉRMINOS, CAMPECHE, MÉXICO.**

**T E S I S**

que para optar por el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS  
MICROBIOLOGÍA**

presenta

**LAURA NATALY RIVERA GARCÍA.**

**Director de Tesis:** Dra. María Leticia Arena Ortiz

**Comité Tutorial:** Dr. Bruno Gómez-Gil Rodríguez Sala

Dr. Miroslav Macek

Dra. Patricia Bonilla Lemus

Dra. Gloria Vilaclara Fatjó

México, D.F. Junio de 2015

## AGRADECIMIENTOS

Ante todo agradezco al Dr. Luis Ángel Maldonado Manjarrez, quién impulsó este trabajo, realizado en el laboratorio de Bioprospección y Diversidad Bacteriana del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, y que fungió como mi tutor principal de maestría hasta noviembre de 2014.

Agradezco al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, principalmente al personal de la Coordinación, quienes siempre me han apoyado en todos los aspectos académico-administrativos necesarios, e incluso con algunos consejos que me han permitido mejorar mi desempeño.

A CONACYT, por el apoyo recibido con una beca para poder llevar a cabo mis estudios de maestría.

Agradezco de igual manera a los miembros del Jurado, por sus comentarios, puntos de vista y al tiempo invertido, que le da a la construcción de esta Tesis una parte de ellos: A la Dra. Leticia Arena..., quién me ha apoyado de manera invaluable para la conclusión de la tesis y el ajuste de su contenido y estructura, haciendo la función de directora de tesis durante esta fase final; al Dr. Bruno Gómez-Gil Rodríguez Sala, por sus atenciones e interés por mi aprendizaje; al Dr. Miroslav Macek, por aportar una visión amplia, a la vez que específica y a profundidad. Aunque son de incorporación más reciente, de igual manera a las Dras. Patricia Bonilla Lemus y Gloria Vilaclara Fatjó, por sus importantes aportaciones para mejorar la tesis. Sin duda a todos agradezco su ayuda, apoyo y consideración, que han sido para mí una señal de confianza y me han permitido aprender, junto con lo enseñado por el Dr. Maldonado, los fundamentos más importantes -en contenido, estructura y forma- incluidos en mi trabajo de maestría.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Es tan común escuchar un gran dicho “lo que no, te mata te hace más fuerte” y jamás lo había sentido tanto como hoy, incorporando todo en mí y darme la oportunidad de percibir que, no estoy muerta, y sí, soy más fuerte y además muy feliz porque encontré a personas humanas, a las que les quiero agradecer con todo mi corazón.

Justamente en el Instituto de Ciencias del mar y limnología en la clase de estadística donde aprendí otras situaciones, mas, que sobre la materia, y una de esas fue cuando el Prof. Margarito Alvares menciono-“en la vida hay que ser agradecidos, con todos, no importa si fue malo, medio bueno...”, y de verdad quisiera a gradecer a los “malos”, pero como es mi tesis y son mis agradecimientos, puedo hacer mi voluntad, y solo agradeceré a ilustres, trascendentales y sobre todo “guapos” individuos.

Por su puesto, a kikidi mi mami Cristina García, quien me ha puesto delante de ella y yo la he puesto por delante en los agradecimientos, (risas) y que de hoy en adelante espero retribuirle todo su esfuerzo, lágrimas y sobre todo su paciencia. Te amo mami.

A mi hermanita Ana Karen quien ha estado conmigo, sufriendo mis caídas, celebrando mis levantones y sufrido mis coreografías. Creo que jamás se lo he dicho, te amo ññ.

A mis amigos de la vida, Gaby, Nanis, Marche, Ara, Pavel y Jugo que casi no nos vemos, pero cuando nos vemos... nos echamos porras, nos queremos, nos entendemos aunque haya pasado el tiempo y algunos ya sean padres, quiero que estén en mi vida hasta que seamos pasitos.

A dos mujeres que admiro la Dra. Gloria Vilaclara y la Dra. Erika Quintana, ellas dan sin mirar a quien, además inteligentes, brillantes etc., cuando sea grande quiero ser como ellas.

A mis nuevos compas Lili, Clau, Esmé, Erick y Aby, por una nueva visión, que me han mostrado con sus acciones y allá nos vemos Veracruz, Baja, Chiapas, Tabasco.

A los que indirectamente me presionaron social y económicamente, como familia, mis prestamistas y mis mascotas Monkey, Fabri y de paso Azul.

Y sobre todo a DIOS, por ponerme en este momento de este día, de este mes, de este año, de este siglo, en esta época y darme el pretexto de poder agradecerte y agradecerle a todos. Gracias y confió en ti.

## Resumen

La Laguna de Términos en Campeche México, alberga una importante biodiversidad, sin embargo no se reconoce en particular como una fuente importante de la clase Actinobacteria. La importancia de las Actinobacterias, como es bien sabido, radica en la potencial producción de antibióticos, en la biotecnología, además de tener un uso potencial en acciones de Biorremediación, así como las interacciones ecológicas que juegan dentro de los sistemas en este caso la Laguna de Términos, siendo esta una fuente idónea para el aislamiento de estos organismos. Por esta razón en este trabajo se analizaron muestras provenientes de la Laguna de Términos para el aislamiento selectivo de Actinobacterias filamentosas. El aislamiento se realizó tomando cinco muestras de sedimento en el estero Pargos de la Laguna de Términos, por medio de dos técnicas de aislamiento; la tradicional dilución y la segunda por estampado, además de utilizar cuatro medios con diferentes composiciones nutricionales. El conteo de unidades formadoras de colonias, muestra un rango con un mínimo de  $3.0 \times 10^3$  y un máximo  $1.0 \times 10^5$  CFU mL<sup>-1</sup>. Se aislaron 45 cepas consideradas de la clase Actinobacteria, las cuales se dividieron en dos grandes grupos nombrados “Streptomycetaceae” y “Micromonosporaceae”, tomando en cuenta sus características morfológicas coloniales, principalmente el aspecto, la luz reflejada y el color del micelio sustrato, el aéreo y la masa de esporas.

Al grupo “Streptomycetaceae” pertenecen 29 aislados de los cuales se redujeron a un total de 20 cepas pertenecientes al quimiotipo I, debido a la presencia del aminoácido L-DAP en la pared de este género (determinada por cromatografía de capa fina). En relación al grupo “Micromonosporaceae” por sus características, se puede decir que efectivamente pertenecen a este género, sin embargo no hay una confirmación molecular.

En los dos grupos altamente diferenciados tanto morfológicamente como en las proporciones del número de aislados, se encontró un contraste en la técnica de aislamiento debido que para el grupo “Streptomyces” fue más eficaz el estampado, mientras que para “Micromonospora” fue la de dilución, el medio de aislamiento más efectivo fue el medio 3 y el sitio de muestreo con más aislados fueron la Boca del Estero y la estación Bahamitas.

La predominancia de los géneros *Streptomyces* y *Micromonospora* en ambientes terrestres así como de zonas costeras se confirma debido a que el muestreo se realizó principalmente en un estero el cual forma parte de una laguna costera de barra, y hay una influencia considerable fluvial, donde se dan procesos de mineralización de la materia orgánica.

# INDICE GENERAL

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
PHYLUM ACTINOBACTERIA	1
MORFOLOGÍA	2
CICLO DE VIDA	4
DESARROLLO COLONIAL	5
FAMILIA STREPTOMYCETACEAE	6
FAMILIA MICROMONOSPORACEAE	8
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>10</b>
MÉTODOS DE CULTIVO	10
ESTUDIO QUIMIOTAXONÓMICO	11
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>12</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>13</b>
OBJETIVO GENERAL	13
OBJETIVOS PARTICULARES	13
<b>ÁREA DE ESTUDIO</b>	<b>13</b>
UBICACIÓN	13
CLIMA	14
HIDROLOGÍA	15
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>16</b>
MUESTREO	17
ESTUDIO MICROBIOLÓGICO	19
AISLAMIENTO PRE-TRATAMIENTOS DEL SEDIMENTO:	19
MEDIOS DE AISLAMIENTO	19
CULTIVO	20
CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	20
IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA	21
EXTRACCIÓN DE ADN	21
ELECTROFORESIS	22

AMPLIFICACIÓN (PCR)	22
CARACTERIZACIÓN QUIMIOTAXONÓMICA	23
CONTEO MICROBIOLÓGICO	24
<b>RESULTADOS</b>	<b>25</b>
AISLAMIENTO	25
CONTEO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS	37
CRECIMIENTO EN MEDIOS ISP	38
EXTRACCIÓN DE ADN	40
ANÁLISIS DAP	41
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>43</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>50</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>51</b>
APÉNDICE 1	59
APÉNDICE 2	61
APÉNDICE 3	62



## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Características específicas para cada tipo de pared (Prescott et al.,1999).....	12
Cuadro 2. Características principales de la Laguna de Términos .....	14
Cuadro 3. Sitios de muestreo: coordenadas y parámetros medidos. ....	18
Cuadro 4. Medios de inoculación usados.....	20
Cuadro 5. Medios estándares utilizados en el Proyecto Internacional de <i>Streptomyces</i> .....	21
Cuadro 6. Volumen de reactivos utilizados en las reacciones de PCR. ....	23
Cuadro 7. Cepas del morfotipo Streptomycetaceae.....	26
Cuadro 8. Cepas del morfotipo Micromonosporaceae.....	30
Cuadro 9. Número de aislados por sitio de muestreo.....	33
Cuadro 10. Número de aislados por medio de cultivo.....	33
Cuadro 11. Número de aislados por técnica de pretratamiento. ....	33
Cuadro 12. Unidades formadoras de colonias a una disolución de $10^{-3}$ , en cada uno de los sitios de muestreo.....	37

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol filogenético de la clase <i>Actinobacteria</i> , basado en 16S ARNr.	1
Figura 2. Morfología de algunos géneros de actinomicetos.	3
Figura 3. Ciclo de vida del género <i>Streptomyces</i> .	4
Figura 4. Diagrama idealizado de una sección a través del centro en el óptimo de esporulación.	5
Figura 5. Características quimiotaconómicas, morfológicas y fisiológicas de cepas de <i>Kitasatospora</i> , <i>Streptacidiphilus</i> y <i>Streptomyces</i> .	7
Figura 6. Porcentajes relativos de organismos cultivables y no cultivables.	10
Figura 7. Batimetría de la Laguna de Términos.	15
Figura 8. Esquema general de los métodos utilizados en este estudio.	17
Figura 9. Ubicación de los sitios de muestreo.	18
Figura 10. Representación de Estampado en placa.	19
Figura 11. Gráficas de los dos grupos identificados, en porcentaje.	35
Figura 12. Características observadas de las 20 cepas remanentes, en los 7 diferentes medios ISP probados.	39
Figura 13. Productos de extracción de ADN cepas de morfotipo <i>Streptomyces</i> .	40
Figura 14. Productos de PCR de clase <i>Actinobacteria</i> .	40
Figura 15. Productos de PCR del gen 16S ARN.	41
Figura 16. Cromatografía en capa fina de L-DAP de las cepas <i>Streptomyces</i> A.	42
Figura 17. Cromatografía en capa fina de L-DAP de las cepas <i>Streptomyces</i> B.	42

# INTRODUCCIÓN

## PHYLUM ACTINOBACTERIA

El nombre de Actinobacteria es de origen griego, proviene de las raíces *actis-inos* rayo y *bacter* de bastón; el sufijo *-ia* denota el phylum, pudiéndose denominar “hongo radiado”, dadas sus características, parecidas a las de los hongos pertenecientes al Dominio Eukarya. Más tarde, con las técnicas moleculares se diferenció como un Phylum importante dentro de las bacterias gram-positivas.

Este Phylum es uno de los más extensos dentro del Dominio Bacteria, contiene 5 clases, 19 órdenes, 50 familias y 221 géneros. El nombre de las clases es Acidimicrobia clase. nov., Actinobacteria (Stackebrandt et al., 1997), Coriobacteriia clase nov., Rubrobacteria clase nov., y Thermoleophilia clase nov. (Whitman et al., 2012)

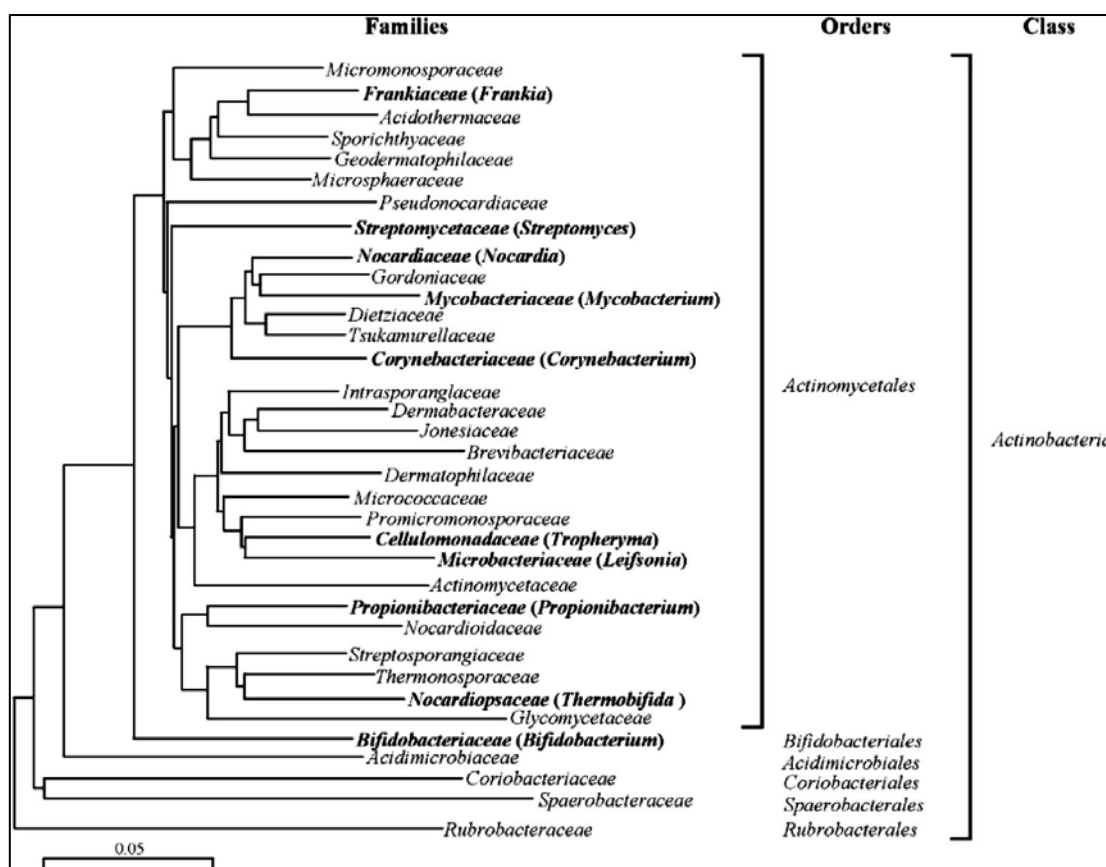


Figura 1. Árbol filogenético de la clase Actinobacteria, basado en 16S ARNr. (Ventura et al., 2007).

La clase Actinobacteria (Stackebrandt et al., 1997), contiene 15 órdenes: Actinomycetales, Actinopolysporales, Bifidobacteriales, Catenulisporales,

*Corynebacteriales*, *Frankiales*, *Glycomycetales*, *Jiangellales*, *Kineosporiales*, *Micrococcales*, *Micromonosporales*, *Propionibacteriales*, *Pseudonocardiales*, *Streptomyetales* y *Streptosporangiales*. Sin embargo, las especies más estudiadas se encuentran principalmente en el Orden *Actinomycetales* y sus Familias más representativas (Figura 1).

Las Actinobacterias son organismos procariotas, sus células carecen de membrana nuclear y organelos; además poseen un solo cromosoma que se encuentra libre en el citoplasma y una pared celular rígida. La principal característica de este grupo se manifiesta en el patrón de ramificación del gen 16S ARNr (Garrity y Hold, 2001), el acomodo distintivo de sus genes (Kunisawa, 2007), la conservación de algunas proteínas, por ejemplo citocromo-c oxidasa, y por la presencia de material insertado en el gen 23S ARNr (Gao y Gupta, 2005; Gao *et al.*, 2006).

Se compone de bacterias gram-positivas o tinción gram variable, algunas son aerobias, anaerobias o anaerobias facultativas, con una pared celular rígida que contiene ácido murámico, mientras que algunas contienen también ácidos teicoicos. La mayoría son quimio-organótrofas que crecen en pHs neutros; sin embargo, algunas han desarrollado afinidades diversas, como son las acidófilas, alcalófilas, halófilas e incluso termófilas (Whitman *et al.*, 2012).

La mayoría son saprofitas, pero algunas son patógenos para plantas y animales. Los intervalos de contenido de ADN G+ C van -en moles- de poco menos del 50% (géneros *Hoyosella* y *Tropheryma*) a más del 70% (*Frankia* y *Streptomyces*).

## MORFOLOGÍA

---

Se observa una clara concordancia entre la morfología, el ciclo de vida y el desarrollo colonial de las Actinobacterias, aspectos que se verán adelante con más detalle.

La descripción de algunos tipos de morfología se basa en el grupo *Streptomyces* como género principal, cuando se cultivan en medio sólido; no sólo forman un fino micelio ramificado, sino que también producen una hifa aérea que se diferencia en cadenas de conidiosporos (Figura 3). Cada conidiosporo puede, a su vez, generar una colonia micelial (Phaff, 1981).

Es importante mencionar que se encuentran notables diferencias en los términos que se usan para nombrar las estructuras de estos organismos; generalmente, el micelio ramificado se denomina vegetativo o sustrato y está formado de hifas que van de 0.3-0.5µm de diámetro y 20µm de longitud, aproximadamente; cada una de las células contiene en su interior varios nucleoides. Por encima del micelio

vegetativo se desarrolla en el micelio aéreo, que puede o no desarrollarse en ciertos géneros, como ocurre en *Rhodococcus* (Figura 3), *Micromonospora* y *Salinispora* (Jensen *et al.*, 1991; Maldonado *et al.*, 2008).

Ya sea después del desarrollo del micelio sustrato o en el micelio aéreo, se da la formación de esporas producidas en hifas especializadas; de manera general, estas estructuras carecen de movilidad, aunque algunos géneros poseen esporas flageladas. La mayoría no muestran termorresistencia, pero si soportan la desecación y, por lo tanto, se pueden adaptar a muchos medios diferentes. Las esporas producidas por los diferentes géneros son útiles para la determinación taxonómica, por medio de su tamaño, número, forma y disposición (Prescott *et al.*, 2002).

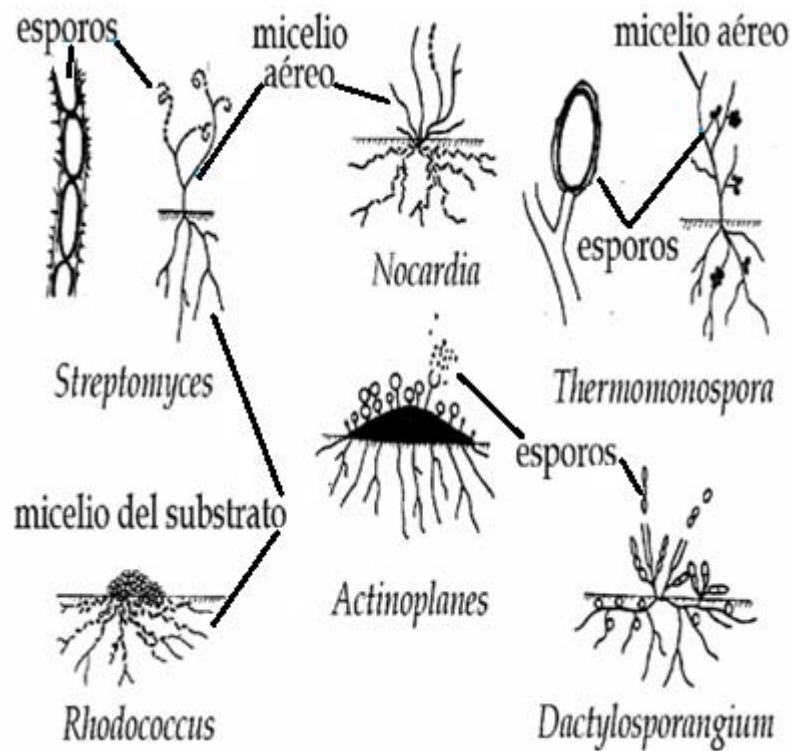


Figura 2. Morfología de algunos géneros de actinomicetos, tomado de Williams, 1989.

Los ciclos de vida muestran una rápida proliferación y esporulación, y las poblaciones pueden mantenerse durante periodos de tiempo prolongados; muestran actividad bio-degradativa al secretar un amplio conjunto de enzimas que les permiten metabolizar moléculas resistentes a la biodegradación. Esta flexibilidad metabólica y morfológica les otorga un gran potencial para los procesos de biorremediación, incluso para la eliminación de metales (Albarracín *et al.*, 2005).

De igual manera, las Actinobacterias desempeñan un papel muy importante en la sostenibilidad a largo plazo de sistemas naturales y transformados por el ser humano, debido a su importancia en la descomposición de la materia orgánica, fijación de nitrógeno (como *Frankia* sp.), la degradación de agroquímicos y el control biológico de plagas de plantas y animales (Williams et al., 1984).

## CICLO DE VIDA

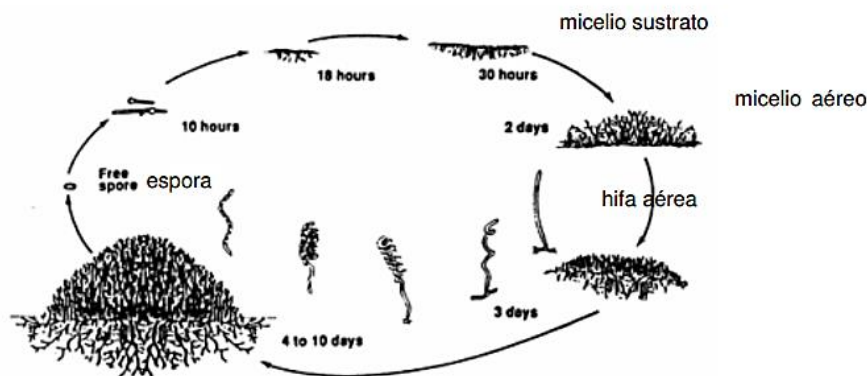


Figura 3. Ciclo de vida del género *Streptomyces* (Extraído de Sanz, 2005)

El ciclo de *Streptomyces* se muestra de ejemplo, porque es uno de los géneros que cuenta con mayor información generada, dado el interés en su estudio ya que es significativo en la biotecnología, debido a que forman parte de los principales productores de antibióticos: *S. aureofaciens* (tetraciclina), *S. erythraeu* (eritromicina), *S. fradiae* (neomicina), *S. griseus* (estreptomicina), *S. racemosus* (terramicina), *S. venezuelae* (cloranfenicol), etc. También hay patógenos de humanos, aunque, por ahora, los únicos conocidos de este género son *S. sudanensis* (Quintana et al., 2007) y *S. somaliensis* patógenos de la dermis.

Aunque el ciclo de este género es importante, no se puede considerar como general para este grupo. De hecho, la gama de morfologías en las Actinobacterias es muy rica, incluyendo formas como cocos (por ejemplo, *Dermacoccus* y *Micrococcus*), bacilos cortos (como *Mycobacterium* y *Tropheryma*), bacilos irregulares (del estilo de *Mycetocola*), cocobacilos (por ejemplo, *Arthrobacter* y *Brevibacterium*) y micelios que se fragmentan en elementos cocoides (observables en *Nocardia*) (Whitman et al., 2012).

Adicionalmente, dentro de un mismo orden podemos observar toda la gama de desarrollos miceliales, como ocurre, por ejemplo, dentro del orden *Actinomycetales*: *Actinomyces* y *Arthrobacter* tienen un desarrollo micelial muy escaso o ausente; *Nocardia* muestra un micelio intermedio y fragmentado, y finalmente *Streptomyces* presenta un desarrollo micelial completo, diferenciado en micelio de sustrato y aéreo, así como esporas reproductivas en el extremo de las hifas (Figura 3).

## DESARROLLO COLONIAL

---

Como ya se ha mencionado, el desarrollo de una colonia en condiciones experimentales, por lo general permite la identificación de acuerdo con las diferencias en tres estructuras: el micelio sustrato, micelio aéreo y la masa de esporas.

En la figura 4 se muestra el crecimiento de *Streptomyces coelicolor* en la cual se puede observar (Wildermuth, 1969), en primer lugar, que la colonia crece centrífugamente; segundo, que la proporción de células de lisis aumenta hacia el centro y en los bordes donde se encuentran apenas células intactas; por último, unas manchas blancas indican el micelio aéreo joven que probablemente se alimentaba de la parte en descomposición de la antigua colonia sobre la que éste crece (Hirano et al., 2006).

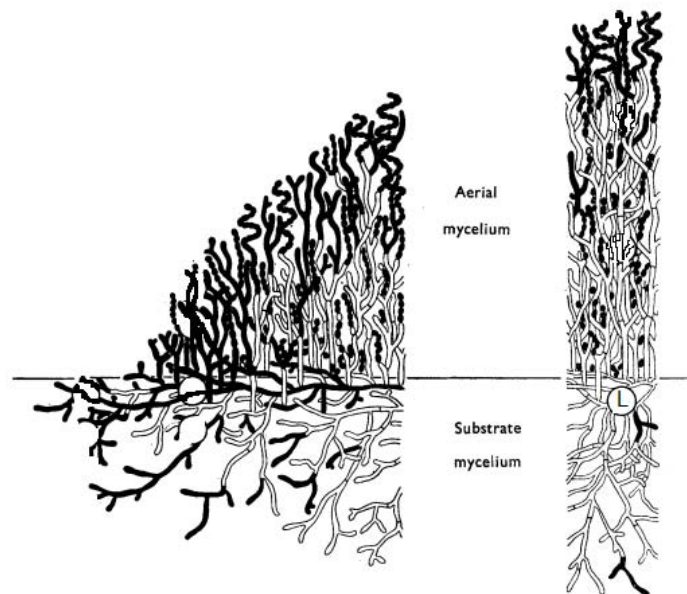


Figura 4. Diagrama idealizado de una sección a través del centro en el óptimo de esporulación: en negro células intactas y en blanco células desintegradas o completamente en lisis (tomado Wildermuth, 1969).

A pesar de la gran variabilidad encontrada en las Actinobacterias, dado que el grupo más estudiado es el de la Familia Streptomycetaceae, a continuación se ahondará en sus características. Asimismo, se ofrecen datos específicos de la Familia Micromonosporaceae, porque recientemente ha sido también muy estudiada, dado que posee interés comercial y se han reportado, al igual que la familia anterior, como frecuentes en zonas costeras y marinas (Weyland 1981; Goodfellow y Haynes 1984). Habiéndose encontrado ambos morfotipos en el presente estudio.

## FAMILIA STREPTOMYCETACEAE

---

Pertenece al suborden *Streptomycineae*, con una sola familia, *Streptomycetaceae* (Anderson y Wellington, 2001). A su vez se clasifican en tres géneros *Streptomyces*, *Kitasatospora* (Zhang *et al.*, 1997) y *Streptoacidiphilus* (Kim *et al.*, 2003). La Familia Streptomycetaceae presenta características de su Phylum (Actinobacteria), por ejemplo, son gram positivas y presentan un alto contenido de G + C; adicionalmente, muestran características específicas de la familia, como: bacterias no ácido-alcohol resistentes, que forma un micelio sustrato ampliamente ramificado. Estos organismos son productores de una amplia variedad de pigmentos responsables de la coloración del micelio sustrato y del micelio aéreo. Se desarrollan en diferentes intervalos de pH y son quimiorganotrofos, con un metabolismo tipo oxidativo (Whitman *et al.*, 2012).

En relación con el género *Streptomyces*, Waksman y Henrici (1943) introdujeron el término actinomicetos para bacterias aerobias formadoras de esporas, que anteriormente habían sido llamadas *Actinomyces* (Baldacci, 1939). A menudo reciben el nombre de estreptomicetos (del griego *streptos*, doblados o torcidos, y *myces*, hongos).

Los géneros *Streptomyces*, *Streptoacidiphilus* y *Kitasatospora* son difíciles de diferenciar fenotípicamente; en la figura 5 se muestran algunas características morfológicas, fisiológicas y quimiotaxonómicas (Kim *et al.*, 2003).

En la pared celular de su micelio aéreo, el género *Streptomyces* contiene LL-ácido diaminopimérico (L-DAP) y glicina, pero sin un azúcar característico en la pared, siendo entonces una pared de tipo I (Lechevalier y Lechevalier, 1970b); la composición de bases del ADN está en el intervalo de 69 al 73% mol de Guanina y Citosina (Pridham y Tresner, 1974a). Es importante notar que tanto *Streptomyces* como *Streptoacidiphilus* comparten el ácido diaminopimérico en su pared (Figura 5).



En *Streptomyces*, el micelio sustrato o vegetativo tiene hifas de 0,5 a 2,0  $\mu$ m de diámetro, raramente se fragmenta. El micelio aéreo forma cadenas de tres a muchas esporas en la madurez. Algunas especies presentan cadenas cortas de esporas en el sustrato micelio y otros forman esclerocios, picnidios, esporangios o estructuras similares (Prescott et al., 2002).

	<i>Streptomyces</i>	<i>Kitasatospora</i>	<i>Streptacidiphilus</i>
Largas cadenas de esporas formadas en la hifa aérea	+	+	+
Óptimo rango de pH	6.5-8.0 <sup>b</sup>	n d	4.5-5.5
Rango de pH para crecer	5.0-11.5	5.5-9.0	3.5-6.0
Isómeros hidrolizados en todo el organismo	LL-A <sub>2</sub> pm	LL y meso-A <sub>2</sub> pm <sup>c</sup>	LL-A <sub>2</sub> pm
Azúcares diagnóstico hidrolizadas todo el organismo	None	Galactose <sup>d</sup>	Galactose, rhamnose
Fosfolípidos predominantes	DPG, PE PI, PIMs	DPG, PE PI, PIMs	DPG, PE PI, PIMs
Contenido G+C en ADN(mol%)	66-73	70-74	70-72

Figura 5. Características quimiotaxonómicas, morfológicas y fisiológicas de cepas de *Kitasatospora*, *Streptacidiphilus* y *Streptomyces*. DPG, difosfoglicerol; PE, fosfatidiletanolamina; PI, fosfatidinositol; PIMs, fosfatidilinositol manosidas. (Tomado de Kim et al., 2003)

Los conidios de cada cadena a menudo están pigmentados y pueden ser de una textura lisa, peluda o espinosa. Los estreptomicetos producen esporas las cuales contribuyen a su supervivencia en periodos largos de sequía, heladas, presión hidrostática, y condiciones anaeróbicas producidas por la saturación del agua. Las esporas son inmóviles (Korn y Kutzner, 1992).

Las colonias son discretas, coriáceas, o butirosas. A menudo, las colonias muestran inicialmente una superficie lisa, pero más tarde desarrollan el micelio aéreo, este puede parecer flocoso, granular, en polvo, o aterciopelado. Puede producir una amplia variedad de pigmentos responsables para el color del micelio vegetativo y aéreo y también muchas cepas son capaces de producir una o más sustancias antibióticas (Prescott et al., 1999).

El hábitat natural de la mayoría de los estreptomicetos es el suelo, donde constituyen del 1 al 20% de la población cultivable (Prescott *et al.*, 1999), sin embargo han sido frecuentemente reportados en sistemas costeros (Jensen *et al.*, 1991, Maldonado *et al.*, 2005; 2009).

De forma parecida a lo comentado para los actinomicetos, los estreptomicetos desempeñan un papel importante en la mineralización, son flexibles desde el punto de vista nutricional, y pueden degradar sustancias resistentes como la pectina, lignina, quitina, queratina, látex y compuestos aromáticos. Aunque la mayoría de ellos son saprofitos, no patógenos, unos pocos se asocian a enfermedades de plantas y animales (Prescott *et al.*, 1999).

Las especies de *Streptomyces* se determinan mediante la identificación de características morfológicas y fisiológicas, incluyendo las siguientes: el color de los micelios aéreo y del sustrato, la disposición de las esporas, las características de la superficie de la spora, la utilización de carbohidratos, la producción de antibióticos, la síntesis de melanina, la reducción de nitrato y la hidrólisis de urea y ácido hipúrico (Prescott *et al.*, 1999).

*Streptomyces* y otros géneros relacionados con una pared del tipo I, que se explicarán más adelante, han mostrado una forma filogenética distintiva en estudios de secuenciación de nucleótidos del gen 16S (Stackebrandt y Woese, 1981).

## FAMILIA MICROMONOSPORACEAE

---

La familia Micromonosporaceae (Stackebrandt *et al.*, 1997) abarca 17 géneros, de los cuales resaltan *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Dactylosporangium*, *Salinispora* y *Verrucosipora*, debido a que se han detectado en sedimentos marinos (Mincer *et al.*, 2002; Maldonado *et al.*, 2005a, 2009).

El género *Micromonospora* (Orskov 1923) se ha denominado a partir de las raíces griegas *mikros*, pequeño, *monos*: una y *spor*: spora. Se caracteriza por tener esporas únicas y carecer de micelio aéreo. Al crecer estas colonias en medios sólidos, inicialmente presentan un color amarillo o naranja claro, que va cambiando hasta llegar a naranja, rojo marrón, azul verdoso o morado. Al madurar las colonias adquieren un color progresivamente más oscuro, con la producción de esporas café a negras y se vuelven con una consistencia mucosa. Claramente son bacterias gram positivas con alto contenido de Guanina y Citosina en su ADN, son quimio-organótrofas y aerobias (Hirsch *et al.*, 2009).

El género *Micromonospora* se caracteriza por tener una pared celular de tipo II, lo que significa que el péptidogluano de la pared celular contiene ácido meso-diaminopimérico, además que es frecuente -en hidrolizados totales celulares- la presencia de los azúcares glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa y manosa.

Al igual que otras Actinobacterias, el género *Micromonospora* posee un elevado potencial de producción de metabolitos secundarios (Fiedler *et al.*, 2005); a partir de estas cepas se han obtenido una gran variedad de antibióticos, tales como aminociclitolos (gentamicinas y sisomicinas), macrólidos (mycinamicina y rosamicina) (Lazzarini *et al.*, 2000)

# ANTECEDENTES

## MÉTODOS DE CULTIVO

El estudio de Actinobacterias ha sido llevado a cabo tradicionalmente mediante técnicas de cultivo-dependiente. A este respecto, es importante resaltar que, la historia de las relaciones de parentesco principalmente la descrita por Woese (1987) para denominar a los tres dominios se realizaron a partir de organismos cultivados.

A pesar de lo anterior, se ha estimado que más del 99% de los organismos del Dominio Bacteria observados en la naturaleza no son cultivables usando técnicas estándar (Amman *et al.*, 1995); entonces, sólo el 1 % es cultivable, lo que ciertamente se trata de una proporción muy baja. Pero otros autores (Hugenholtz *et al.* 1998) mencionan que en Actinobacteria este porcentaje es mayor para los organismos cultivables que para los no cultivables (Figura 6).

Hiltner y Störmen (1903) fueron los primeros en cuantificar este grupo en el suelo, encontrando que representan cerca del 13 al 30% de los microorganismos. Posteriormente, Conn *et al.* (1996) reportaron que las Actinobacterias representan más del 40% de la comunidad en suelos ricos en raíces y aproximadamente el 21% en suelos cultivados.

Con base en la literatura relevante citada, las Actinobacterias, se han identificado principalmente en el ambiente suelo. También son comunes en una variedad de hábitats de agua dulce (Denisova *et al.*, 1999; Zwart, 2002). Sin embargo, existen muchos menos reportes en aguas marginales entre las continentales y las marinas, como son las lagunas costeras. En tanto, en estudios de columna de agua, se ha observado la tendencia de las Actinobacterias a distribuirse según gradientes de los diversos parámetros físico-químicos analizados (Lozupone y Knight, 2007).

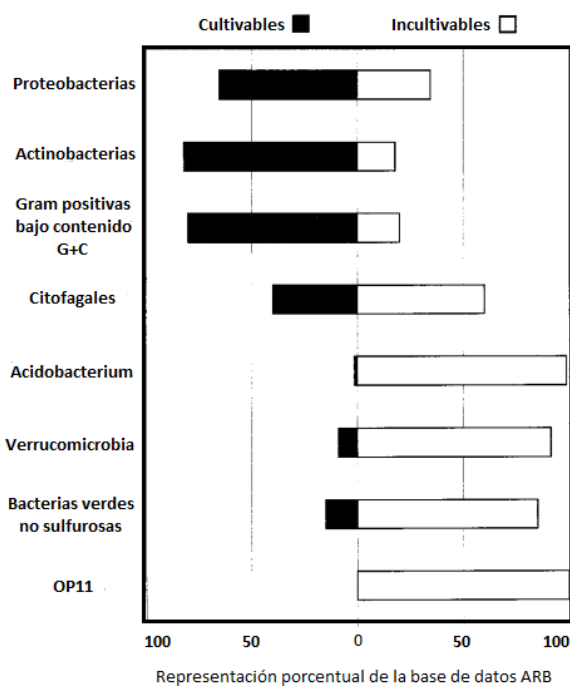


Figura 6. Porcentajes relativos de organismos cultivables y no cultivables, de un compilado de 5224 y 2918 secuencias, respectivamente (Tomado de Hugenholtz *et al.*, 1998).

En sedimentos (Stach *et al.*, 2003) se ha estimado la diversidad bacteriana en secciones a diferentes profundidades, encontrando un patrón de dominancia en las secciones muestreadas según su profundidad, además de un decremento en el número de especies conforme aumenta la profundidad.

Con los avances de la biología molecular, progresivamente hay mayores facilidades para la secuenciación de genes para las Actinobacterias; sin embargo, el problema sigue siendo en muchos casos el aislamiento de estos organismos. En ambientes lacustres, por ejemplo para el grupo *Micromonospora* que se pensaba era particularmente representativo en estos sistemas resultó que no es así (Glöckner *et al.*, 2000). Otros trabajos previos mostraron, en sedimentos marinos, una dominancia compartida de *Micromonospora*, *Rhodococcus* y *Streptomyces* (Goodfellow y Haynes, 1984; Colquhoun *et al.*, 1998).

Los géneros más abundantes entre los microorganismos marinos de la clase Actinobacteria son *Micromonospora*, *Rhodococcus* y *Streptomyces* (Maldonado *et al.*, 2005b). También en otro tipo de aguas de muy variada composición como en lagos del “Middle Plateau” de Yunnan en China se han aislado un gran número de géneros, hasta 60 diferentes, siendo *Micromonospora* el más importante, seguido de *Streptomyces* (Xu *et al.*, 1996).

A pesar de que la tendencia en los estudios de Actinobacterias en aguas ha mostrado la recurrencia e importancia de estos dos géneros, el uso de procedimientos selectivos han permitido el aislamiento de taxones de Actinobacteria no registrados previamente, evidenciando la rica diversidad existente en sedimentos marinos (Maldonado *et al.*, 2005). Particularmente, en México (Golfo de California y Golfo de México) se han aislado Actinobacterias relacionadas a los géneros *Actinomadura*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Micromonospora*, *Nonomuraea*, *Salinispora*, *Rhodococcus*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Streptomyces*, “*Solwaraspora*” y *Verrucosipora* (Maldonado *et al.*, 2009). Sin embargo, no hay un seguimiento de reportes anteriores realizados, por ejemplo, en el Golfo de México, lo que evidencia aún más la carencia de estudios de diversidad en sistemas marinos nacionales.

## ESTUDIO QUIMIOTAXONÓMICO

---

La composición de la pared celular de los actinomicetos varía mucho según los grupos y tiene una importancia taxonómica considerable. Cabe distinguir cuatro tipos principales de tipos de pared celular según la composición y estructura del péptidoglicano: el aminoácido de la posición 3 de la cadena lateral del tetrapéptido, la presencia de glicina en los puentes interpeptídicos y los azúcares que contiene el péptidoglicano. El DAPA o ácido diaminopimélico es un derivado de aminoácido que

forma parte de la pared celular de numerosas bacterias. En el cuadro 1 se puede observar los tipos de paredes y los géneros relacionados; notablemente, la pared tipo I corresponde al grupo *Streptomyces*, aunque se han identificado algunos miembros del género *Actinomadura* con esta característica (Whitman *et al.*, 2012).

Los extractos celulares de actinomicetos con paredes celulares de los tipos II, III y IV contienen también azúcares característicos útiles para la identificación (Cuadro 1). Otras propiedades de valor taxonómico, mencionadas con anterioridad, son la morfología y el color de los micelios y esporangios, las características superficiales y la disposición de los conidiosporos, el porcentaje de G + C en el ADN, la composición fosfolipídica de las membranas celulares.

Cuadro 1. Características específicas para cada tipo de pared (Prescott *et al.*, 1999).

Tipo de pared celular	Isómero de ácido diaminopimérico	Grupo	Patrón de Azúcares	G + C % mol	Géneros relacionados
I	L,L	Streptomyces	Ninguno de valor taxonómico	69-78	<i>Streptomyces</i> <i>Actinomadura</i>
II	Meso	Actinoplanes	Arabinosa Xilosa	71-73	<i>Actinoplanes</i> <i>Dactylosporangium</i> <i>Micromonospora</i>
III	Meso	Maduromicetos	Madurosa Ninguna	64-74	<i>Planomonospora</i> <i>Streptosporangium</i>
IV	Meso	Nocardioformes	Arabinosa galactosa	59-79	<i>Nocardia</i> <i>Rhodococcus</i>

## JUSTIFICACIÓN

La importancia de las Actinobacterias presentes en distintos ecosistemas se debe a sus diversas características morfológicas y metabólicas, tanto para la producción de metabolitos secundarios, como en el reciclamiento de la materia orgánica, o en la fijación de nitrógeno, ya sea en ambiente libre o asociados con algún otro organismo.

Podemos encontrar las bacterias en cualquier lugar. A pesar de su ubicuidad poco se ha estudiado en cuanto a la diversidad de Actinobacterias en lagunas costeras, teniendo estos ambientes características distintivas que se reflejan en el balance hidrodinámico y la estratificación salina. Debido a la transición entre el ambiente marino y terrestre, además de ser captor de materia orgánica, y albergar una alta diversidad de especies marinas del Dominio Eukarya. Podría también serlo para especies bacterianas, por lo que es muy probable que la lista de Actinobacterias sea mayor de lo reportada a la fecha.

## **OBJETIVOS**

---

### **OBJETIVO GENERAL**

---

Conocer las Actinobacterias cultivables en los sedimentos superficiales de cinco puntos de muestreo de la Laguna de Términos, Campeche, México.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

---

1. Aislar cepas con características específicas de Actinobacterias mediante las propiedades macroscópicas coloniales.
2. Determinar la eficacia de dos tipos de pretratamientos del sedimento, el estampado y la dilución.
3. Determinar la utilidad de los medios enriquecidos y oligotróficos, para el aislamiento de Actinobacterias.
4. Comparar la presencia o ausencia de las distintas cepas aisladas en los sitios de muestreo.
5. Registrar de forma aproximada las tendencias de variación del número de Actinobacterias cultivables en los sitios de muestreo, con base en el método de Conteo de Unidades Formadoras de Colonias.

## **ÁREA DE ESTUDIO**

---

### **UBICACIÓN**

---

La laguna de Términos se localiza entre los 19° 10' y 18° 05' de latitud norte y 92° 12' y 91° 10' de longitud oeste. Coordenada central aproximada: 18° 40' N; 91° 45' W. Se localiza en la parte sureste del Golfo de México, en el estado de Campeche, colinda hacia el norte con Isla del Carmen, entre el río San Pedro y San Pablo al occidente, y con el área de drenaje del Estero de Sabancuy hacia el oriente. Las dimensiones de la laguna son: 70 km de largo y 30 km en su porción más ancha, con un área de 1,700 km<sup>2</sup> (Gómez-Reyes *et al.*, 1977).

Presenta dos bocas de conexión permanente con el mar: Puerto Real, ubicada entre el extremo este de la Isla del Carmen y la isla aguada; El Carmen, en el extremo oeste (Figura 7). El agua oceánica entra a la laguna con un flujo neto de 1,350 m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup> en una dirección este-oeste (Mancilla y Vargas, 1980). El fondo de la laguna es plano y sólo existen canales de profundidades considerables estimadas entre 12 y 17 m en las bocas de Puerto Real y El Carmen, respectivamente. La profundidad promedio de la laguna es de 3.5 metros y la máxima de 4.7m (Cuadro 2).

Cuadro 2. Características principales de la Laguna de Términos

<b>Laguna de Términos</b>	
<b>Área</b>	<b>1700 km<sup>2</sup></b>
<b>Profundidad</b> <small>media</small>	<b>3.5m</b>
<b>Profundidad</b> <small>máx.</small>	<b>4.7m</b>
<b>Volumen</b> <small>aprox.</small>	<b>5 x10<sup>9</sup> m<sup>3</sup></b>
<b>Salinidad</b> <small>min-max</small>	<b>12- 38.2</b>
<b>T °C</b> <small>min-max</small>	<b>28.6-35.8</b>
<b>Clima</b>	<b>Cálido húmedo</b>

## CLIMA

La región presenta tres diferentes tipos de clima (de acuerdo a Köppen modificada por García (1973): a) Clima cálido sub-húmedo intermedio con lluvias en verano (Aw1(w)) en la Isla Aguada, frente a la Boca de Puerto Real; b) Clima cálido sub-húmedo con mayor humedad (Aw2(w)) en la zona que rodea la Laguna de Términos, incluyendo la Isla del Carmen, y c) Clima cálido húmedo con abundantes lluvias en verano (Am (f)) en la zona Palizada.

Presenta un patrón estacional de temperatura con máximos de 35.8° C durante la época de secas y con mínimos de 18.6° C durante la época de nortes. La precipitación se inicia en el mes de junio cuando sobrepasa los 100 mm/mes, y se mantiene en ese rango hasta octubre-noviembre, período que se considera como la



época de lluvias. Para los meses de noviembre a febrero se observa una ligera disminución en el patrón de lluvias (época de nortes) para los meses de febrero a mayo se registran los mínimos considerados como época de secas. La evaporación es de 1,500 mm/año (FIR).

Las mareas son del tipo mixto diurno con rangos en la Isla del Carmen de 0.43 m. Las corrientes en el Canal Boca del Carmen varían dentro del rango de 20-65 m s<sup>-1</sup> durante marea baja y hasta 86 m s<sup>-1</sup> en marea alta. El tiempo de recambio de agua de la laguna es entre 2 y 3 meses, considerando que tiene un volumen aproximado entre 5 x 10<sup>9</sup> m<sup>3</sup>.

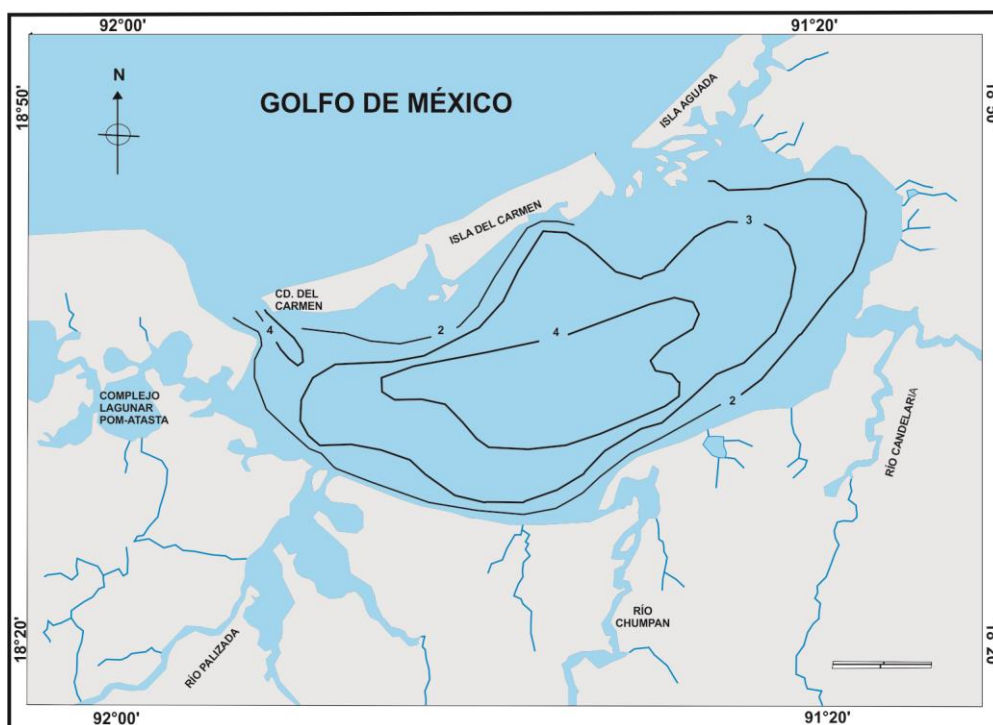


Figura 7. Batimetría de la Laguna de Términos. (Modificado de Yañez, 1963)

## HIDROLOGÍA

La región es parte del complejo ecológico de la planicie costera que controla los procesos deltaicos del sistema de ríos Grijalva-Usumacinta, que es el de mayor volumen de descarga de agua dulce y sedimentos terrígenos hacia el mar en todo el país. La descarga de ríos que desembocan en la laguna, los vientos dominantes del este y la corriente litoral provocan que el agua del Golfo entre a la laguna mediante

la Boca de Puerto Real y salga por la Boca del Carmen. En el periodo invernal boreal, la presencia de vientos del norte produce un efecto de retención del agua fluvial e ingreso de agua marina a los ecosistemas estuarinos. Por lo somero de la cuenca, los vientos en general efectúan una mezcla vertical en la columna de agua, provocando la resuspensión de sedimentos y nutrientes, que son finalmente exportados a la plataforma en la Sonda de Campeche. Está incluida en la lista Ramsar por su bosque de mangle, por proteger especies en peligro de extinción y por su extensión (FIR).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

Para la realización de este estudio se necesitó, en primera instancia, la recolección de sedimentos superficiales de la Laguna de Términos, con el fin de lograr el aislamiento de microorganismos por dos métodos: estampado (Mincer *et al.*, 2002) y la tradicional dilución. Estos aislados fueron tratados para su análisis fenotípico o

morfológico de acuerdo con el ISP (International Streptomyces Project) (Shirling y Gottlieb, 1960), y al formar agrupaciones de las cepas aisladas se realizaron los análisis genotípicos como la amplificación de la región que determina si pertenece a Actinobacteria, así como la amplificación del gen 16S (Figura 8).

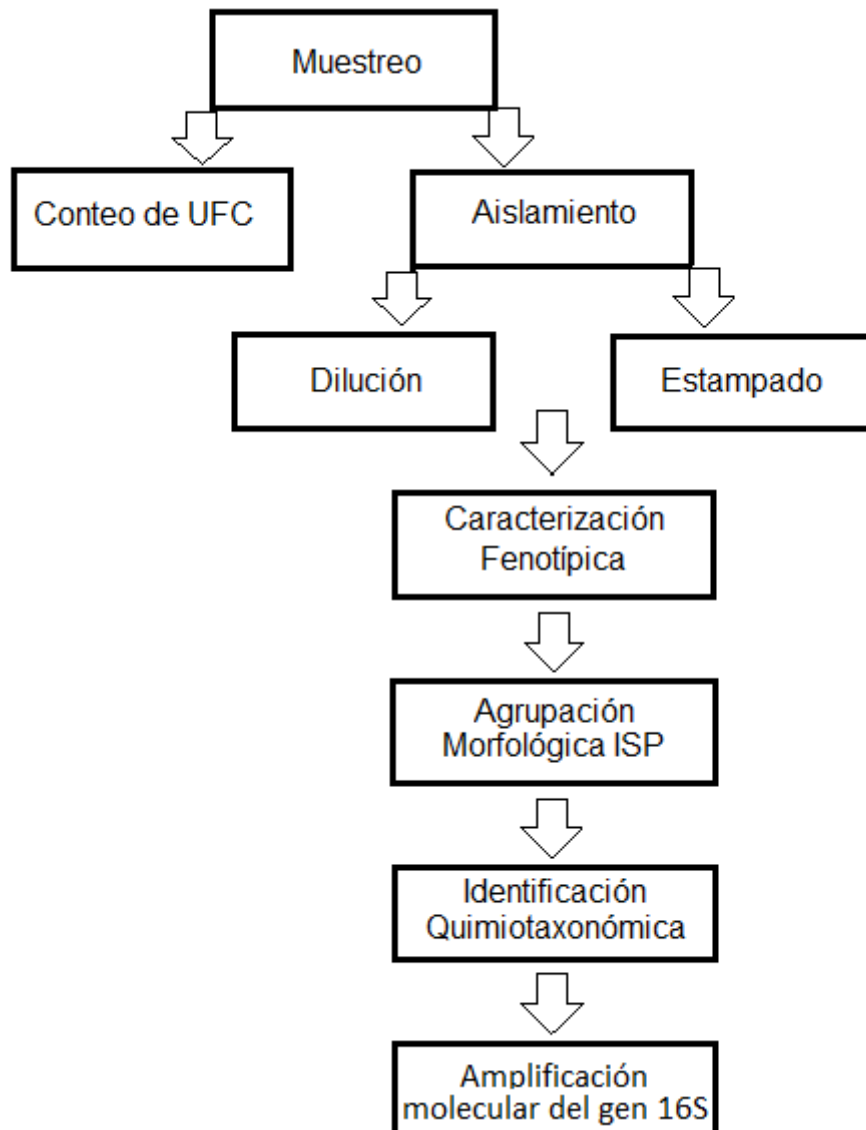


Figura 8. Esquema general de los métodos utilizados en este estudio.

## MUESTREO

---

Se tomaron muestras en 5 los lugares de la región. Las muestras se tomaron con una draga manual que se encuentra en la Estación de la UNAM en El Carmen,

Campeche, México. Se tomaron tres muestras en el Estero Pargo y dos más en la laguna (Figura 9).

Los puntos donde se colectaron las muestras fueron nombrados de acuerdo a su localización en la laguna. Sitio A, Cabeza del estero; sitio B, Frente a la estación, o parte media; sitio C, Boca del estero; sitio D, Bahamitas y sitio E, El Cayo. Se realizaron las mediciones de los parámetros físico-químicos: salinidad (con un medidor portátil YSI 30), pH (medidor Hanna modelo HI98127), el oxígeno disuelto y temperatura mediante un instrumento portátil YSI 100 (Cuadro 3).



Figura 9. Ubicación de los sitios de muestreo.

Cuadro 3. Sitios de muestreo: coordenadas y parámetros medidos.

Sitio de Muestreo	Coordenadas		Salinidad UPS	Temp. (°C)	pH	Oxígeno disuelto (mgL <sup>-1</sup> )
	Lat.	Long.				
A Cabezal del Estero	N 18° 40' 04''	O 91° 44' 32''	35.5	29.3	7.9	4.6
B Frente a la estación	N 18° 39' 05''	O 91° 45' 33''	34.3	28.7	8.0	3.1
C Boca del Estero	N 18° 38' 05''	O 91° 46' 33''	33.1	28.5	8.0	4.4
D Bahamitas	N 18° 39' 05''	O 91° 45' 33''	38.2	26.9	-	-
E El Cayo	N 18° 38' 1''	O 91° 41' 58''	36.4	26.8	-	-

Las muestras se conservaron en hielo y/o congelación hasta su procesamiento en la Unidad de Ciudad Universitaria.

### AISLAMIENTO PRE-TRATAMIENTOS DEL SEDIMENTO:

- A)** Estampado en placa: Se secó 5 g de sedimento bajo una campana de flujo laminar durante 24 h. Se trituró el sedimento y se tomó con una torunda estéril de 1 cm de diámetro (hecha con algodón y gasas) para estamparlo sobre el medio de cultivo previsto en la caja Petri, y se siguió con el estampado en forma de círculo, en sentido de las manecillas del reloj, hasta cubrir toda la caja Petri a manera de dilución, de tal manera que el primer círculo estampado contenga mucho más sedimento que el último (Mincer *et al.*, 2002).

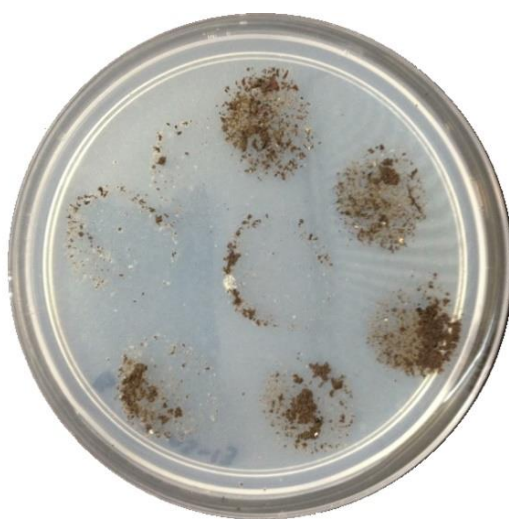


Figura 10. Representación de Estampado en placa (Mincer *et al.*, 2002).

- B)** Diluciones seriadas: Se tomó un gramo de sedimento y se colocó en 9 mL de Agua de mar estéril (Dilución 1:10) Se transfirió una alícuota de 1 mL de la dilución 1:10 a 9 mL de agua de mar estéril (Dilución 1:100) y una última que fue de 1:1000. Inocular 100μL de la dilución 1:1000 sobre el medio de aislamiento.

### MEDIOS DE AISLAMIENTO

Los medios de aislamiento han sido referenciados para el aislamiento de Actinobacterias cultivables y filamentosas (Mincer *et al.*, 2002; Becerril *et al.*, 2012).

Se utilizaron medios de aislamiento con diferencias en su composición nutricional; con bajos nutrientes (1) hasta medios enriquecidos (2-4).

1) Agar 18 g L<sup>-1</sup>, \*

2) Agar 18 g L<sup>-1</sup>, manitol 0.5 g L<sup>-1</sup> y casa amino ácidos 0.1 g L<sup>-1</sup> \*

3) Agar 18 g L<sup>-1</sup>, triptona 0.6 g L<sup>-1</sup>, casitona 1.0 g L<sup>-1</sup> y glucosa 0.8 g L<sup>-1</sup> \*

4) Agar y medio de aislamiento de actinomicetos\*

\*Ciclohexamida (a una concentración final de 100 µg mL<sup>-1</sup>).

## CULTIVO

Se empleó la siguiente batería de medios de cultivo que han sido reportados previamente para el aislamiento de Actinobacterias: Agar Glucosa–Extracto de Levadura–Extracto de Malta (GYM), Agar Glucosa–Extracto de Levadura (GYEA) y Agar Avena, todos estos suplementados con Rifampicina 5 µg mL<sup>-1</sup>, antibiótico para impedir el crecimiento de bacterias no deseadas (usualmente del género *Bacillus*) y Ciclohexamida 10 µg mL<sup>-1</sup>, para evitar hongos y levaduras. En los dos procesos (aislamiento y cultivo) se incubaron a 28°C durante tres semanas aprox. Aquellas colonias con las características micro y macroscópicas típicas de Actinobacteria fueron resembradas en medio de cultivo nuevo y subcultivadas hasta que el cultivo esté estuviera puro.

Cuadro 4. Medios de inoculación usados.

Medios de inoculación	Composición nutrimental
GYM	Agar, Glucosa, Extracto de levadura y Extracto de Malta
GYEA	Agar, Glucosa, extracto de levadura
Avena	Agar y avena

## CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

En esta etapa se realizó la caracterización fenotípica de los organismos aislados en los medios de cultivo establecidos por Shirling y Gottlieb en 1960:

ISP-1 (Tryptona-Extracto de levadura); ISP-2 (extracto de levadura y malta); ISP-3 (Agar avena); ISP-4 (sales inorgánicas-Almidón agar), ISP-5 (Agar glicerol-Aspargina); ISP-6 (Peptona-Levadura) y ISP-7 (Agar Tirosina) como la determinación del color del micelio, sustrato de la masa de esporas además del color de los pigmentos difusibles en cada uno de los medios (Cuadro 5), para la determinación de cepas similares.

Cuadro 5. Medios estándares utilizados en el Proyecto Internacional de *Streptomyces*.

MEDIO ISP	DETERMINACIONES
ISP-1: Tryptona-Extracto de Levadura.	Color, producción de melanina
ISP-2: Extracto de Levadura-Extracto de Malta	Color
ISP-3: Agar Avena	Color
ISP-4: Sales Inorgánicas-Agar Almidon	Color
ISP-5: Glicerol-Agar Aspargina	Color y produc. de pigmentos
ISP-6: Peptona-Agar Extracto de Levadura Hierro	Producción de melanina
ISP-7: Agar Tirosina	Producción de melanina

## IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA

### EXTRACCIÓN DE ADN

De cada cultivo puro se extrajo el material genético (ADN), en tubos eppendorf (1.5mL) en ellos se agregaron 100µg de perlas de vidrio y 500 µL de solución amortiguadora GTE (Glucosa-Tris-EDTA). Se tomaron dos asadas de biomasa fresca (7-10 días después de la siembra) y se colocaron en los tubos preparados y etiquetados para guardarlos a 4°C de 12-24horas. Pasado este periodo se agitaron en un Vortex (Daigger) a máxima velocidad por 15 min. Seguida de una centrifugación a 13500 x g por 10 min. El sobrenadante se transfirió a nuevos tubos eppendorf 1.5 mL

y se desecharon los tubos con las perlas y biomasa. A los nuevos tubos se les agregó 1:1 de fenol cloroformo y alcohol isoamílico, respecto al volumen trasferido, para agitarlos en el vórtex por 5 s a máxima velocidad y centrifugar por 10 min a 13500 x g. Se recuperó el sobrenadante y transfirió a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL y se les agregó 1:1 de fenol cloroformo y alcohol isoamílico, respecto al volumen trasferido, para agitarlos en el vórtex por 5 seg a máxima velocidad y centrifugar por 10 min a 13 500 x g y transferir a un nuevo tubo de 1.5mL. Se precipitaron con etanol absoluto (2:1) y se dejó durante dos horas en refrigeración. Después de este tiempo, se centrifugaron por 10 min a 13500 x g y se decantó el exceso de etanol. Para lavar se agregaron 200 µL de etanol al 70% desprendiendo pellet, centrifugar por 10 min a 13500 x g, lavar y centrifugar de nuevo. Se secaron a 44°C por 2 horas con la tapa abierta. El ADN se reconstituyó al añadir 50 µL de Tris EDTA, tratando de despegar el ADN. Se colocaron en baño seco a 55°C durante 1hora agitando cada 15 min. La visualización del ADN se realizó por electroforesis horizontal.

## ELECTROFORESIS

Se pesó un gramo de agarosa el cual se agregó a 100mL de solución amortiguadora TBE 0.5, aplicando calor, hasta disolver la agarosa. Se le agregó 0.75µL de Bromuro de Etidio, dejando enfriar por aproximadamente 30min, para vaciar en una charola para electroforesis, esta mezcla se dejó enfriar en una campana de extracción hasta su gelificación.

Para el montaje del gel, en cada poso se agregaron 3µL de ADN (descrito arriba) y 4µL de solución amortiguadora de corrida, al término de las muestras se colocó el marcador de peso molecular. Después la charola con el gel de agarosa se situó en una cámara de electroforesis, en ella se vació el buffer BTE, hasta cubrir el gel. Después se programó a 75V por 45min. Al terminar la programación el ADN se visualizó en un transiluminador y por medio de un fotodocumentador, la imagen se guardó en una memoria.

## AMPLIFICACIÓN (PCR)

Se realizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) empleando primers específicos para la clase Actinobacteria, (254F y 1360R) esperando amplificar un producto de alrededor 650 pares de bases (bp). En el caso de la amplificación del gen 16S se usaron los primers 27F (5'-AGAGTTTGATCMTTGGCTCAG-3') y 1525R (AAGGAGGTGWTCCARCC-3') con un tamaño de amplificado de 1500 pb (Lane. 1991). (Cuadro 6)



El proceso se realizó con un termociclador marca Labnet modelo MultiGene mini, donde se establecieron las condiciones para la amplificación para determinar la clase: 35 ciclos a 95°C por 10 minutos, 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto. Y para la amplificación del 16S las condiciones fueron las siguientes: 35 ciclos a 95°C por 2 minutos, 95°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos y 72°C por 30 segundos. Los productos de PCR se examinaron por electroforesis en gel agarosa al 1% para las dos amplificaciones.

CUADRO 6. Volumen de reactivos utilizados en las reacciones de PCR.

Reactivo	Vol $\mu$ l
Buffer	2.5
MgCl <sub>2</sub>	0.75
dNTPs	0.625
Primers (254F y 1360R)	0.25
ADN	0.4
Taq Polimerasa	0.1
H <sub>2</sub> O	15.525
16S	Vol $\mu$ l
Buffer	5
Primers (27F y 1525R)	5
ADN	0.35
MyTaq Polimerasa	0.2
H <sub>2</sub> O	9.45

## CARACTERIZACIÓN QUIMIOTAXONÓMICA

Para la identificación se consideró la composición química de la pared celular, la cual está formada por un péptidoglicano unido al arabinogalactano que forma esterres con ácidos micólicos, a su vez el péptidoglicano está formado por una cadena de disacáridos repetidos (N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico) y mediante un enlace amido el N-acetilmurámico se une un tetrapéptido: L y D-alanina, D-glutámico, meso-diaminopimélico y L-diaminopimélico, que se encuentran en diferentes géneros bacterianos. En el caso de *Streptomyces* tiene en su pared la mayor cantidad de LL-ácido diaminopimélico según Lechevalier y Lechevalier (1970). Además de tener como característica de poseer ácidos teicoicos (Naumova et al., 1987) y no contener ácidos micólicos en su pared celular (Goodfellow, 1989).

El análisis DAP se usó precisamente para definir el tipo de tetrapéptido que se presenta en la pared y así definir a nivel de género, según los patrones observados en la cromatografía.

La extracción de ácido diaminopimérico a partir de hidrolizados de todo el organismo de los representantes de la color-grupos se modificó de la de Staneck y Roberts (1974).

Dos o tres asas llenas de biomasa fresca (crecimiento 7-14 días) fueron suspendidos en 500  $\mu$ L de HCl 6N conteniendo 100  $\mu$ g de perlas de vidrio (<106  $\mu$ m de diámetro; Sigma-Aldrich). La suspensión se homogeneizó en un vórtex durante 5 min y luego se coloca en un horno a 100°C durante 4 horas. Después de la centrifugación, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf, dejándolo secar en un calentador multibloque a 100°C (Barnstead Lab-Line), y se añadió 1 ml de agua destilada para reconstituir el hidrolizado (dos veces) para después realizar cromatografía en capa fina (TLC). El volumen final fue de 10  $\mu$ L de cada muestra fueron empleados en las placas de celulosa. Las placas fueron desarrolladas en tanques de vidrio saturados con metanol-agua-6N HCl-piridina (80: 26: 4: 10, v / v) durante 4 h o hasta que el frente del disolvente era de aproximadamente 2 cm desde la parte superior de la placa. Las placas se secaron al aire, rociadas con solución de ninhidrina recién preparada (0.2% p / v disuelto en acetona) y se calentaron para su revelación a 100°C durante 3 min.

## CONTEO MICROBIOLÓGICO

---

Para una estimación aproximada del número de bacterias se empleó el medio Almidón Amoniacal, con el procedimiento de conteo en placa de las cinco muestras, con el fin de poder establecer las unidades formadoras de colonias. Todos los medios y/o componentes para prepararlos se prepararon con Becton Dickison EUA. (Becerril-Espinoza *et al.*, 2012).

## RESULTADOS

---

### AISLAMIENTO

---

Se aislaron un total de 45 cepas en los cinco sitios de la Laguna de Términos en Campeche, encontrando sólo 2 morfotipos, con base en las características principales de grado de sequedad, dureza, brillo y textura. Lo anterior se llevó a cabo por medio de un estereoscopio, con base en las características macroscópicas de cada una de las colonias. De las 45, 29 cepas se ubicaron en 16 grupos en un morfotipo al que se denominó “*Streptomycetaceae*” (Cuadro 7); el otro Morfotipo se denominó “*Micromonosporaceae*” (Cuadro 8), con 16 cepas y 11 grupos.

Estos dos morfotipos fueron determinados tentativamente por sus características macroscópicas:

**Crecimiento**, se registró como nulo (-), poco (+), regular (++) bueno (+++) y abundante (++++) (Figura 12).

**Color**, las colonias variaron de blanco, marfil, gris, café, amarillo, naranja, rojo y negro.

**Forma**, circulares o irregulares.

**Bordes**, siendo delimitadas u otras como lóbulos, filamentos, enrollados, dentada, etc.

**Superficie**, puede ser lisa, rugosa, granular.

**Aspecto**, húmedo o seco.


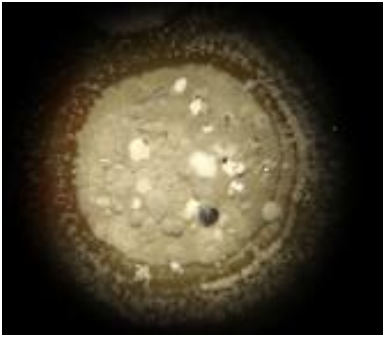


**Luz reflejada**, ser brillante o mate.

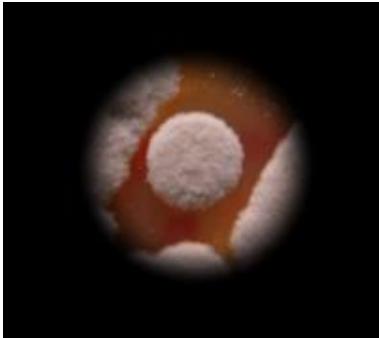



**Producción de pigmento**, se revela en la coloración del medio de cultivo, predominando el café y rojizo.

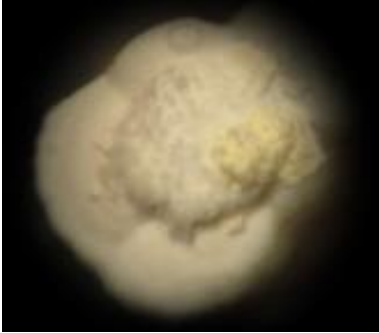
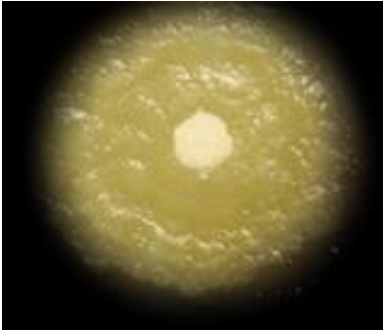
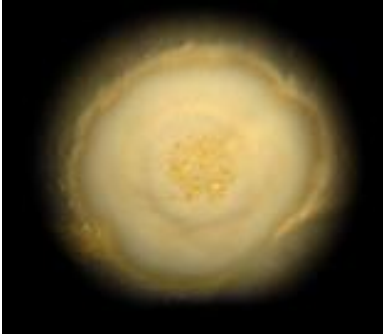
Además, esas características ayudan a establecer si un cultivo está en estado puro o si presenta contaminación. Como se había mencionado anteriormente, se identifican características de un determinado grupo, como en este caso, en que se observaron dos morfotipos muy bien marcados “*Streptomycetaceae*” (Cuadro 7) y “*Micromonosporaceae*” (Cuadro 8).


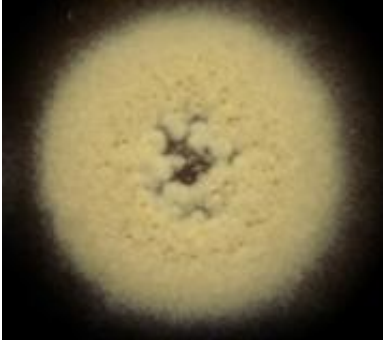
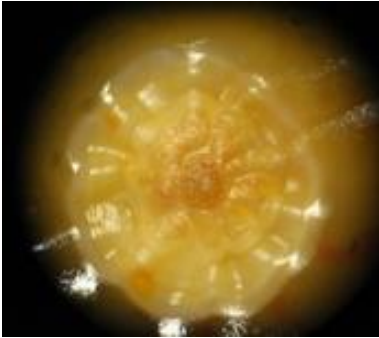

Cabe aclarar que dichos aislados se numeraron entre **LT1 y LT29** para “*Streptomycetaceae*”, y como **LT50 a LT65** para los de tipo “*Micromonosporaceae*”. El hueco entre 29 y 50 se dejó por si se llegaban a aislar otras cepas intermedias. Esta nomenclatura se aplicó para reportar algunos de los resultados subsiguientes.

Cuadro 7. **Cepas del morfotipo Streptomycetaceae.** Indicando el grupo, características morfológicas. Sitio: A (final-estero), B (Estación del Carmen), C (boca-estero), D (Bahamitas), E (Cayo); Medio: 1 (Agar), 2 (Manitol, Casa-aminoácidos), 3 (Tryptona, Casitona, Glucosa), 4 (aísla actinomicetos); Técnica: D (Dilución), E (Estampado).

Grupo	Cepas	Características	Código Sitio- Medio-Técnica	H <sub>2</sub> O Des.
1	LT1, LT6, LT12, LT25 	Colonial. Micelio sustrato marfil. Micelio aéreo blanco, y una masa de esporas color amarillo muy claro.	C - 3 - E C - 2 - E C - 3 - D D - 3 - E	●
2	LT2, LT3, LT19, LT20, LT21 	Colonial. Micelio sustrato marfil. Su micelio aéreo es gris y maduro es	C - 3 - E E - 3 - E C - 3 - E C - 3 - E C - 2 - E	●
3	LT4, LT 11, LT15, LT16 	Colonial. Micelio sustrato marfil. Su micelio aéreo es blanco y la masa de esporas es beige a gris claro.	B - 3 - E D - 2 - E B - 3 - E B - 3 - E	●
4	LT5 	Colonial. Micelio sustrato marfil, mientras que el aéreo es blanco y la masa de esporas blanca.	B - 3 - E	○

Grupo	Cepas	Características	Código Sitio-Medio-Técnica	H <sub>2</sub> O Des.
5	LT7 	Colonial. Su micelio sustrato es marfil, cubierto por micelio aéreo blanco y una masa de esporas gris claro.	D - 2 - E	●
6	LT8, LT18 	Colonial. Micelio sustrato marfil. Su micelio aéreo es blanco. Y una masa de esporas amarilla.	D - 2 - E D - 2 - E	●
7	LT9 	Colonial. El micelio sustrato es marfil. El micelio aéreo es blanco y la masa de esporas beige.	D - 2 - E	●
8	LT10, LT26 	Colonial. Micelio-sustrato marfil cubierto por un micelio aéreo color blanco y una masa de esporas beige muy claro.	D - 2 - E C - 2 - E	●





Grupo	Cepas	Características	Código Sitio-Medio-Técnica	H <sub>2</sub> O Des.
9	LT13 	Colonial. Su micelio-sustrato es marfíl, el aéreo es blanco y la masa de esporas de blanco a amarillo muy claro.	D - 3 - E	●
10	LT14 	Colonia plana Micelio-sustrato marfíl. Micelio aéreo blanco y con un retraso en el desarrollo que las demás.	A - 2 - E	○
11	LT17 	Colonial. Micelio-sustrato blanco, esporas blancas, una masa de esporas blanca y desarrollo de metabolitos secundarios.	D - 3 - E	●
12	LT22*		C - 2 - E	○

Grupo	Cepas	Características	Código Sitio-Medio-Técnica	H <sub>2</sub> O Des.
13	LT23, LT28 	Colonias. Micelio-sustrato blanco con micelio aéreo blanco y masa de esporas beige.	D - 3 - E D - 3 - E	●
14	LT24 	Colonias planas. Micelio-sustrato blanco, Con un micelio aéreo blanco y una masa de esporas amarillezca. Formación de metabolitos secundarios.	C - 2 - D	●
15	LT27 	Colonial. Micelio sustrato de amarillo a rojo. Micelio aéreo es blanco (aquí no se puede apreciar).	C - 2 - E	●
16	LT29 	Colonial. Micelio-sustrato color café, empieza cubrirse de micelio aéreo blanco.	A - 5 - D	●

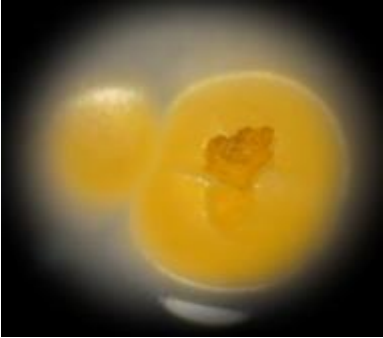
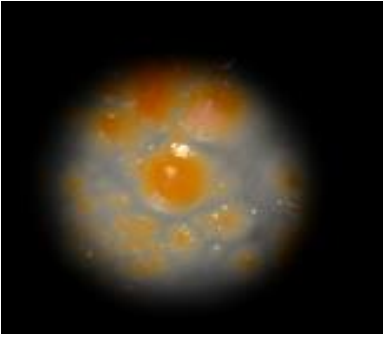
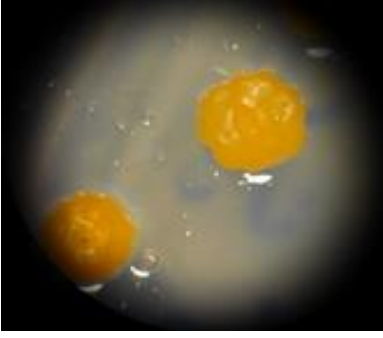
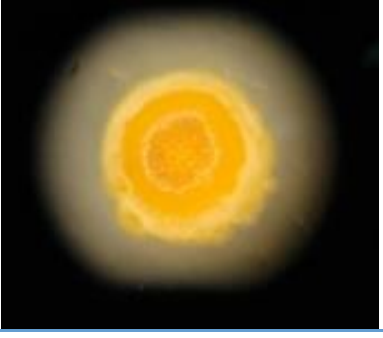
La última columna indica el crecimiento en agua destilada: Si crece (●); No crece (○).

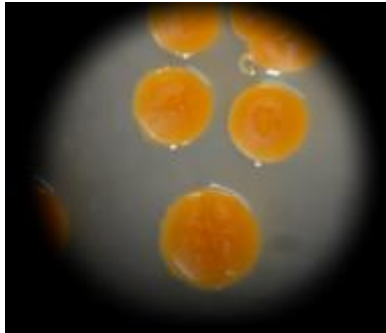
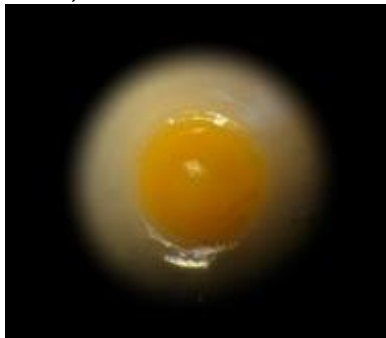
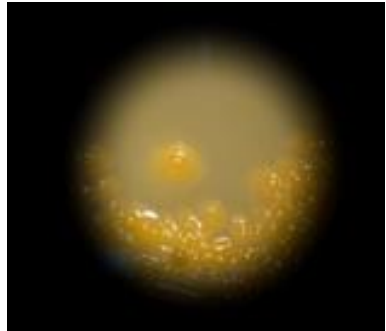
\*Cepa número 22 sin fotografía.

Cuadro 8. **Cepas del morfotipo Micromonosporaceae.** Indicando el grupo, características morfológicas. Sitio: A (final-estero), B (Estación del Carmen), C (Boca-estero), D (Bahamitas), E (Cayo); Medio: 1 (Agar), 2 (Manitol, Casa-aminoácidos), 3 (Tryptona, Casitona, Glucosa).

Grupo	Cepas	Características	Código Sitio-Medio-Técnica
1	<p style="text-align: right;">LT50</p> 	<p>Colonial. Micelio-sustrato amarillo Textura muy suave.</p>	D - 2 - E
2	<p style="text-align: right;">LT53,LT57</p> 	<p>Colonial. Micelio sustrato naranja. Convexa</p>	A - 2 - D A - 3 - D
3	<p style="text-align: right;">LT51</p> 	<p>Colonias umbilicadas irregulares. Micelio sustrato color naranja</p>	D - 2 - E
4	<p style="text-align: right;">LT52</p> 	<p>Colonias convexas. Micelio-sustrato naranja.</p>	A - 2 - E



Grupo	Cepa	Características	Código Sitio-Medio- Técnica
5	LT54,LT55 	Colonias planas. Micelio-sustrato amarillo.	A - 3 - D A - 3 - D
6	LT58 	Colonias circulares. Micelio-sustrato naranja fuerte. Con poco crecimiento.	B - 1 - D
7	LT56 	Colonias convexas, micelio sustrato naranja con consistencia dura.	A - 3 - D
8	LT59 	Colonias planoconvexas. Micelio-sustrato amarillo con un micelio aéreo blanco	D - 4 - D

Grupo	Cepas	Características	Código Sitio-Medio-Técnica
9	LT60,LT61 	Colonias pequeñas y convexas. Micelio-sustrato naranja.	E - 3 - D
10	LT62, LT63 	Colonias pequeñas y convexas, su micelio-sustrato color naranja fuerte. Con crecimiento lento.	A - 1 - D D - 4 - D
11	LT64 	Colonias puntiformes Micelio-sustrato amarillo, Crecimiento rápido y abundante.	B - 2 - D

En los cuadros 7 y 8, se observan las características más importantes de las cepas aisladas de los dos morfotipos.

Cuadro 9. Número de aislados por sitio de muestreo.

	Cabeza del estero	Punto medio	Boca del estero	Bahamitas	El Cayo	Total
<i>Streptomycetaceae</i>	2	4	11	11	1	29
<i>Micromonosporaceae</i>	7	2	0	5	2	16
<b>Total</b>	9	6	11	<b>16</b>	3	<b>45</b>

Cuadro 10. Número de aislados por medio de cultivo.

	Medio 1, agar	Medio 2,	Medio 3	Medio 4	Total
<i>Streptomycetaceae</i>	0	13	15	1	29
<i>Micromonosporaceae</i>	2	6	6	2	16
<b>Total</b>	2	<b>19</b>	<b>21</b>	3	<b>45</b>

Cuadro 11. Número de aislados por técnica de pretratamiento.

	Dilución	Estampado	Total
<i>Streptomycetaceae</i>	3	26	29
<i>Micromonosporaceae</i>	12	4	16
<b>Total</b>	15	<b>30</b>	<b>45</b>

En el morfotipo “*Streptomycetaceae*”, las 29 cepas están repartidas dentro de los cinco sitios de muestreo, encontrando en la Cabeza del Estero: 2 aislados (7%) en el Punto medio del Estero: 4 aislados (14%), en la Boca del Estero: 11 aislados (38%), en el sitio Bahamitas 16, teniendo estos dos puntos el mayor porcentaje, mientras que en el Cayo solamente 1 cepa (3%).

Con respecto a los 4 medios de cultivo, del medio 1 (agar) no se aisló ninguno, del medio 2 se obtuvieron 13 aislados (34%), del medio 3, 15 aislados (40%) y del medio 4 solamente uno.

Mediante la técnica de dilución solo se aislaron 3 cepas, del morfotipo “*Streptomycetaceae*”, por otra parte en el estampado se obtuvieron 26 aislados (Cuadro 11).

Para el morfotipo “*Micromonosporaceae*” de las 16 cepas, se aislaron de la cabeza del estero: 7 (46%), casi la mitad de los aislados, en la parte media solo 2 (7%), en la Boca del Estero ninguna y en el sitio Bahamitas y en el Cayo, se aislaron 5 y 2 (27 y 20%) respectivamente.

Con el medio 1 se aislaron 2 cepas (12%), los medios con mayor porcentaje el 2 y 3 con 6 aislados por cada medio (37 y 38%) y con el medio 4, 2 aislados (13%).

Los resultados obtenidos del pretratamiento, con la técnica de dilución se adquirieron 12 aislados y con estampado solo 4 (80 y 20% respectivamente) (Cuadro 11).

En resumen, las diferencias entre los dos grupos fueron muy notables, en porcentaje, de acuerdo a la obtención de aislados en los dos pretratamientos. Por una parte el morfotipo “Streptomycetaceae” fue recuperado en mayor número usando el pretratamiento de estampado, mientras que “Micromonosporaceae” por dilución, (Figura 11c).

La obtención de los aislados por sitio de muestreo mostraron que la Boca del Estero y al sitio Bahamitas, con mayor número de aislados del morfotipo Streptomycetaceae, en el caso del morfotipo “Micromonosporaceae”, fue la Cabeza del Estero seguido de la estación Bahamitas, siendo este el sitio con mayor número de aislados con un total de 16 aislados de los dos morfotipos (Cuadros 9).

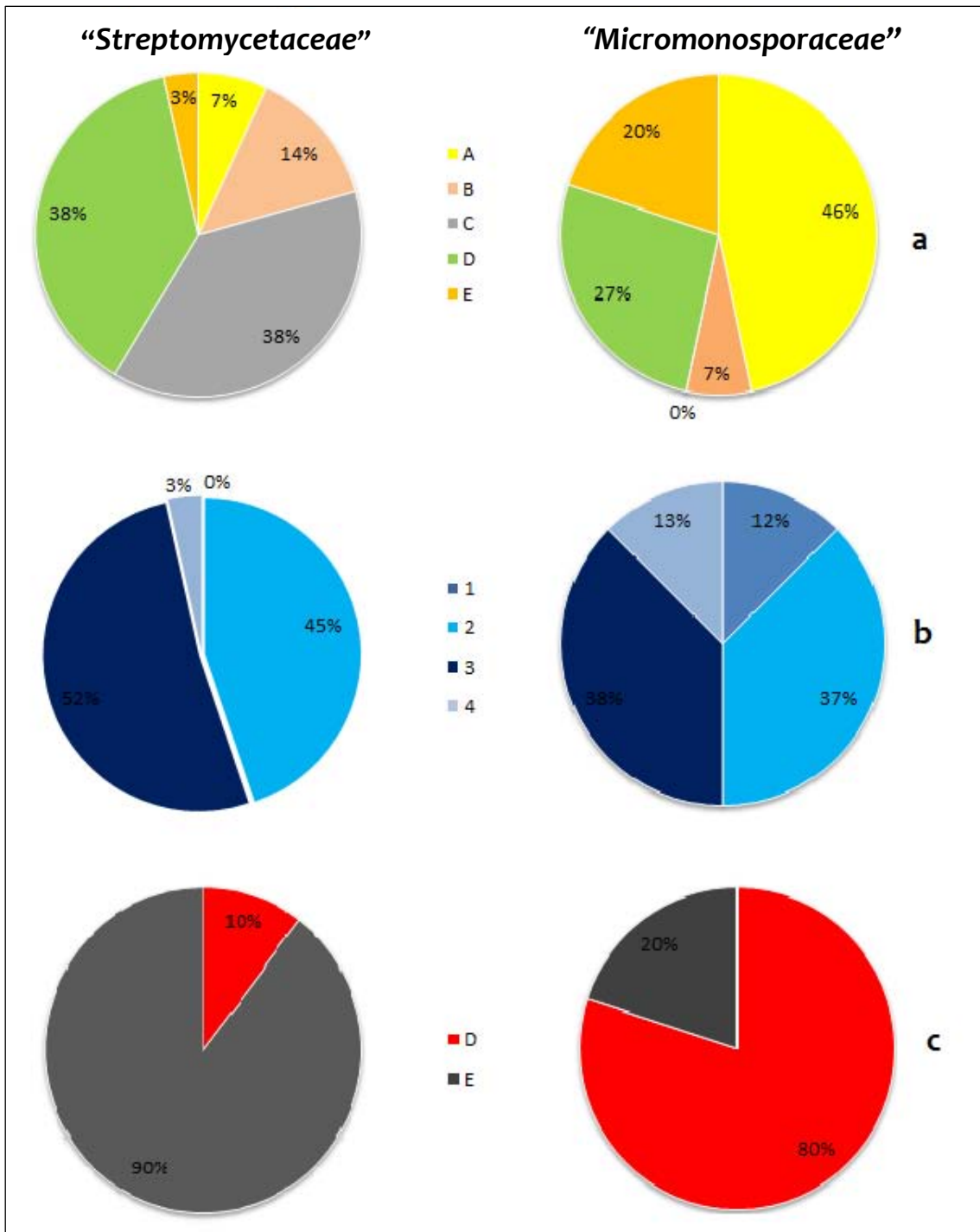


Figura 11. Gráficas de los dos grupos identificados: (a) porcentaje de las cepas aisladas en cada uno de los sitios de muestreo; A Cabeza del Estero, B Frente a la estación, C Boca del Estero, D Bahamitas, E El Cayo. (b) porcentaje de cepas aisladas en cada medio de cultivo: 1 Agar, 2 Agar, Manitol y casa aminoácidos, 3 Agar, Triptona, Casitona y Glucosa, 4 Agar y medio de aislamiento de actinomicetos. (c) porcentaje de cepas aisladas con la técnica D: Dilución y E: Estampado.

En el aislamiento de organismos para los dos grandes grupos, los medios más efectivos fueron dos, el medio 2 formado por Manitol, casa-aminoácidos y el medio 3 conformado por Triptona, Casitona, Glucosa y agar (Figura 11). Estos medios han sido utilizados por otros autores, principalmente para el aislamiento del género *Salinispora* (Torres-Beltrán *et al.*, 2012). Sin embargo, también se plantearon con la finalidad de contener nutrientes en diferentes formas disponibles:

El medio 1: Con sólo agar en su composición, el agar es una mezcla de dos clases de polisacáridos: agaropectina y agarosa, compartiendo como esqueleto la galactosa; la agaropectina está modificada con grupos ácidos: sulfato y piruvato.

El medio 2: La fuente de nitrógeno es el compuesto Casamino-ácidos, el cual es una mezcla de aminoácidos esenciales, excepto Triptófano, y pequeños péptidos libres. La fuente de carbono es el Manitol, s un hexitol, con una estructura química complicada.

El medio 3: Lo conforman la Triptona que se compone de oligopéptidos que no están completamente hidrolizados; tanto los Casamino-ácidos como la Triptona son productos de la caseína (proteína de la leche) rica en calcio y fósforo. Además de Casitona y como fuente de carbono la Glucosa.

El medio 4: Contiene Caseinato de Sodio, Aspargina, Fosfato dipotásico, sulfato de magnesio y sulfato ferroso.

Teniendo en cuenta estos aspectos en la conformación de cada medio, el mayor porcentaje de aislados en este estudio se obtuvo del medio 3, rico en nutrientes, para los dos morfotipos con 21 cepas aisladas. El medio 2 permitió aislar un total de 19 cepas; para el medio 4 se obtuvieron solamente 3 cepas, y para el medio 1 se aislaron dos únicas cepas del morfotipo “*Micromonospora*” (Cuadro 10).

Cada uno de los dos morfotipos se subdividió en grupos, principalmente de cepas muy parecidas y con cierta probabilidad de que resultara ser la misma cepa. Esto se puede observar en los cuadros 7 y 8, donde se ilustra con una imagen de un aislado representativo de cada grupo, además de presentar algunas características distintivas y una clave refiriéndose al sitio de muestreo, medio donde fue aislado y la técnica de pretratamiento. Asimismo, se observa otra columna en donde se probó el crecimiento de las cepas en agua salina, con el fin de registrar si es importante la concentración de sales marinas disueltas en su crecimiento y desarrollo colonial, siendo tres aislados en los que se observó un menor crecimiento, LT5, LT14 y LT22.

## CONTEO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS

---

Para estimar en forma aproximada el número de bacterias a través de las unidades formadoras de colonias se preparó el medio (AA) llamado también Medio Almidón Amoniacal a un pH de 5.5, siguiendo el protocolo de disolución de sedimento a las concentraciones indicadas, cada muestra con repetición. Posteriormente se hizo el conteo a las 24, 48 y 72 horas. Los resultados finales se muestran en el cuadro 12.

Si tomamos en cuenta la localización de los puntos de muestreo notamos que el sitio Bahamitas tiene un conteo de  $3.0 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup>, siendo el mínimo en los conteos, este lugar está muy cercano a la zona urbana. El sitio con la mayor abundancia se presentó en la Boca del Estero con  $1.0 \times 10^5$ , en tanto los demás puntos geográficos, como la Cabeza del Estero, la Parte media y el Cayo mostraron conteos con orden de magnitud de 4.

Cuadro 12. Unidades formadoras de colonias a una disolución de  $10^{-3}$ , en cada uno de los sitios de muestreo.

Sitios de muestreo	UFC mL <sup>-1</sup>
A Cabeza Estero	$3.5 \times 10^4$
B Parte media	$3.0 \times 10^4$
C Boca del Estero	$1.0 \times 10^5$
D Bahamitas	$3.0 \times 10^3$
E Cayo	$5.6 \times 10^4$

## CRECIMIENTO EN MEDIOS ISP

---

La caracterización del morfotipo “Streptomycetaceae” se realizó por la inoculación de las 29 cepas en los primeros 7 medios ISP reportados por Shirling y Gottlieb (1960).

De los 29 aislados en los medios ISP mostrados en la figura 12, del morfotipo “Streptomycetaceae”, solamente quedaron 20 en el grupo 1: Lt1, Lt12; grupo 2: Lt2, Lt3, Lt19; grupo 3: Lt5; grupo 4: Lt7; grupo 5: Lt9; grupo 6: Lt10; grupo 7: Lt6, Lt4, Lt11; grupo 8: Lt14 y Lt15; grupo 9: Lt16; grupo 10: Lt23; grupo 11: Lt24, Lt28; grupo 12: Lt21. Estos nuevos grupos definidos para el análisis genético.

Las características se resumen en la figura 12 donde se pueden observar las características evaluadas en los siete medios ISP utilizados, que principalmente fueron crecimiento, color del micelio sustrato del micelio aéreo y de la masa de esporas, así como el color de los pigmentos en el caso de los medios ISP 1 y 7 indicadores de la producción de melanina, los medios 3 y 6 muestran otro tipo de pigmentos difusibles.

Donde el crecimiento se denota como malo (-), poco (+), regular (++) bueno (+++) y abundante (++++).

Los aislados LT19, LT24 y LT28 mostraron un tono café en el medio ISP- 7, los aislados LT1, LT7, LT10, LT12 presentaron un color amarillo en el medio ISP-1 y en el medio ISP-3 los aislados LT7 mostró un color rojizo, los LT12 y LT21 un tono café.



		LT1	LT2	LT3	LT4	LT5	LT6	LT7	LT9	LT10	LT11	LT12	LT14	LT15	LT16	LT17	LT19	LT21	LT23	LT24	LT28
ISP 1	cre	+++	++++	++++	++	++	++	++++	+++	++++	+++	++	-	-	++	-	++++	++++	-	-	-
	mi-s	Marfil	Marfil	Marfil	Amarillo	Amarillo	Marfil	Marfil	Marfil	Marfil	Marfil	Marfil	-	-	Marfil	-	Marfil	Marfil	-	-	-
	mi-a	Blanco	Blanco	Marfil	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	-	-	Blanco	-	Blanco	Blanco	-	-	-
	ma-esp	Beige fuerte	Gris	Gris pardo	Beige claro	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Amarillo	Ostra	-	-	-	-	-	Gris	Gris	-	-	-
	pig-dif	Amarillo	-	-	-	-	-	Amarillo	-	Amarillo	-	Amarillo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ISP 2	cre	+++	++++	++++	++	++	++	+++	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	++	-
	mi-s	Marfil	Marfil	Marfil	Amarillo	Amarillo	Marfil	Marfil	Marfil	Marfil	Marfil	Marfil	Marfil	Marfil	Marfil	Marfil	Marfil	Marfil	Marfil	Marfil	Marfil
	mi-a	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
	ma-esp	Blanco	Gris	Gris pardo	Beige claro	-	Amarillo	Gris pardo	Ostra	Beige claro	-	Blanco	-	Beige claro	Blanco	Beige fuerte	Gris	Blanco	Beige	Amarillo	-
	pig-dif	-	-	-	-	Amarillo	-	Amarillo	-	Amarillo	-	-	-	-	-	-	-	Rojizo	-	-	-
ISP 3	cre	++	++++	+++	-	-	-	++++	+++	++++	-	++	+++	-	-	++++	-	+++	++	++	+++
	mi-s	Marfil	Marfil	Marfil	-	-	-	Marfil	Marfil	Marfil	-	Marfil	Marfil	-	-	Marfil	-	Marfil	Marfil	Marfil	Marfil
	mi-a	Blanco	Blanco	Blanco	-	-	-	Blanco	Blanco	Blanco	-	Blanco	-	-	Blanco	-	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
	ma-esp	Blanco	Gris claro	Gris	-	-	-	Gris	Amarillo	Beige claro	-	-	-	-	-	Beige fuerte	-	Gris	Beige claro	Blanco	Beige claro
	pig-dif	-	-	-	-	-	-	Rojizo	-	-	-	Café	-	-	-	-	-	Café	-	-	-
ISP 4	cre	++	+++	++++	+	+	++	++++	-	++++	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++
	mi-s	Marfil	Marfil	Marfil	Amarillo	Amarillo	Marfil	Marfil	-	Marfil	Amarillo	Marfil	Marfil	Marfil	Marfil	Marfil	Marfil	Marfil	Marfil	Marfil	Marfil
	mi-a	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	-	Blanco	-	-	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
	ma-esp	-	Gris fuerte	Gris fuerte	Beige claro	Beige fuerte	-	Gris	-	Beige claro	-	Beige claro	-	-	-	Beige claro	Gris	Beige claro	Beige claro	Rosa	Rosa
	pig-dif	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ISP 5	cre	++	+++	++++	-	++	+	++++	+++	++++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	-	-	+++	++	+++
	mi-s	Marfil	Marfil	Ostra	-	Amarillo	Marfil	Marfil	Marfil	Marfil	Marfil	Marfil	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Marfil	-	-	Marfil	Marfil	Marfil
	mi-a	Amarillo	Blanco	Marfil	-	-	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	-	Blanco	-	-	Blanco	Blanco	-	-	Blanco	Blanco	Blanco
	ma-esp	-	Gris	-	-	-	-	-	Beige claro	Ostra	-	-	-	-	-	Blanco	-	-	Beige	-	-
	pig-dif	Café	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ISP 6	cre	++++	++++	++++	-	++	-	+++	-	-	-	+++	-	-	++++	-	++++	-	-	-	-
	mi-s	Ostra	Marfil	Ostra	-	Amarillo	-	Marfil	-	-	-	Café	-	-	Marfil	-	Marfil	-	-	-	-
	mi-a	Blanco	Blanco	Blanco	-	Blanco	-	-	Blanco	-	-	Blanco	-	-	Blanco	-	Blanco	-	-	-	-
	ma-esp	-	Blanco	Blanco	-	-	-	-	Blanco	-	-	-	-	-	-	-	Beige fuerte	-	-	-	-
	pig-dif	Rojizo	-	Café	-	-	-	-	-	-	-	Café	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ISP 7	cre	+++	++	++	+++	+	+++	+++	++++	++++	++	+++	++	++++	++++	+++	+++	-	++	+++	+++
	mi-s	Ostra	Marfil	Marfil	Amarillo	Amarillo	Marfil	Marfil	Marfil	Marfil	Amarillo	Marfil	Ostra	Amarillo	Amarillo	Marfil	Marfil	-	Marfil	Marfil	Marfil
	mi-a	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	-	Blanco	Blanco	-	-	Blanco	Blanco	-	Blanco	Blanco	Blanco
	ma-esp	Beige fuerte	-	-	Blanco	Beige claro	Beige fuerte	-	Amarillo	Ostra	-	-	Blanco	-	-	Beige claro	Gris	-	Beige claro	Blanco	Blanco
	pig-dif	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Café	-	-	Café	Café

Figura 12. Características de las 20 cepas remanentes, en los 7 diferentes medios ISP probados. cre, crecimiento; mi-s, color del micelio sustrato; mi-a, color del micelio aéreo; ma-esp, color de la masa de esporas; pig-dif, color de los pigmentos difusibles.

Al final de la bibliografía en el Anexo 1 se agregaron las imágenes del crecimiento de los estreptomicetos en los medios ISP.

### Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó para las 29 cepas aisladas con morfotipo *Streptomyces*, evidenciando la efectiva extracción del ADN por electroforesis (Figura 13). También se pueden observar algunos aislados con los que no se llevó el seguimiento por los intentos fallidos de extracción.

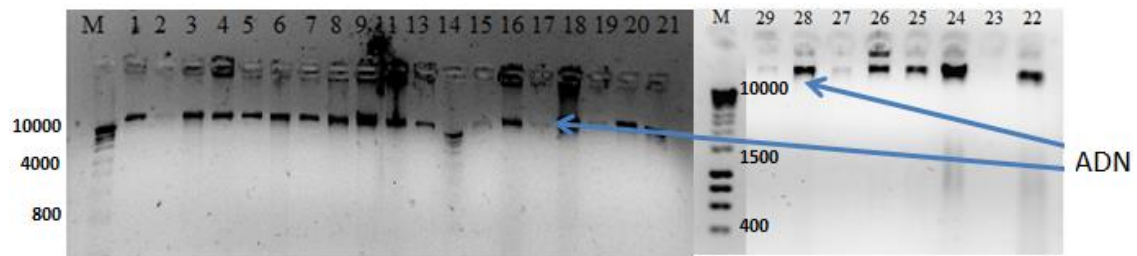


Figura 13. Productos de extracción de ADN cepas de morfotipo *Streptomyces*. M: Marcador de peso molecular. La línea azul señala el ADN, con un peso molecular mayor de las 10000 pb.

Con el fin de confirmar que las 20 cepas pertenecieran a la Clase *Actinobacteria* se realizó un PCR con los Primer 254F y 1360R, y se consideró como positivo el producto con un tamaño de amplificación de 1100 pb (Figura 14). Las condiciones del PCR se describen en el cuadro 5, como las condiciones de la amplificación del gen 16S.

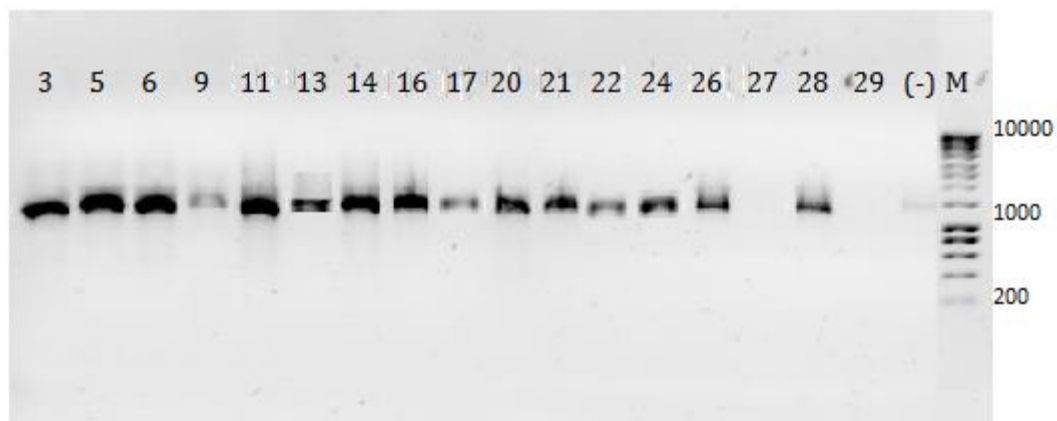


Figura 14. Productos de PCR de clase *Actinobacteria*. M: Marcador de peso molecular.

Además, con el material de las cepas se efectuó un PCR para la amplificación del gen 16S ARNr, con los Primer 27F (5'-AGAGTTTGATCMTTGGCTCA 3') y 1525R (AAGGAGGTGWTCCARCC-3') (Lane, 1991) con un tamaño de amplificado de 1500 pb y su visualización en un gel para electroforesis (Figura 15).

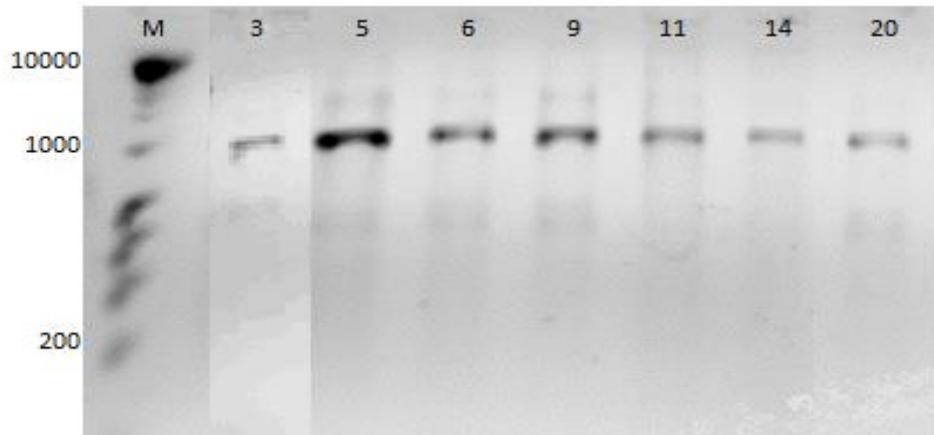


Figura 15. Productos de PCR del gen 16S ARN. M: Marcador molecular.

Los resultados de la caracterización tanto fenotípica como genotípica serían analizados en conjunto para establecer si los estreptomicetos obtenidos del aislamiento selectivo pudieran constituir nuevas especies o bien si se trata de estreptomicetos reportados previamente, pero por situaciones que no estuvieron en nuestras manos no se llegó a ese punto.

## ANÁLISIS DAP

El procedimiento consiste en la hidrólisis de las células bacterianas para la obtención de los aminoácidos de la pared celular. En la placa cromatográfica es posible ver los puntos del DAP en una gama de colores del gris, verde y amarillo con el isómero L siempre moviéndose adelante del isómero meso. Los aminoácidos aparecen morados o rojos y migran delante de los puntos del DAP (Staneck & Roberts, 1974), en las figuras 16 y 17 los aminoácidos se pueden notar en tonos morados y azules hacia el frente del disolvente (parte superior de la placa).

En el género *Streptomyces* un componente característico es el ácido diaminopimélico en la forma LL (L-DAP). En la figura 16 y 17 se muestra una cromatografía, donde se observa que la mayoría tiene el isómero L-DAP, en algunas de ellas es muy poca la cantidad, mientras que, en las cepas Lt6, Lt14 y Lt19 es muy probable que este en mal condición el producto para la cromatografía ya que no muestran ni el estándar (contiene los dos isómeros; LL y meso) o el isómero meso del ácido diaminopimélico.

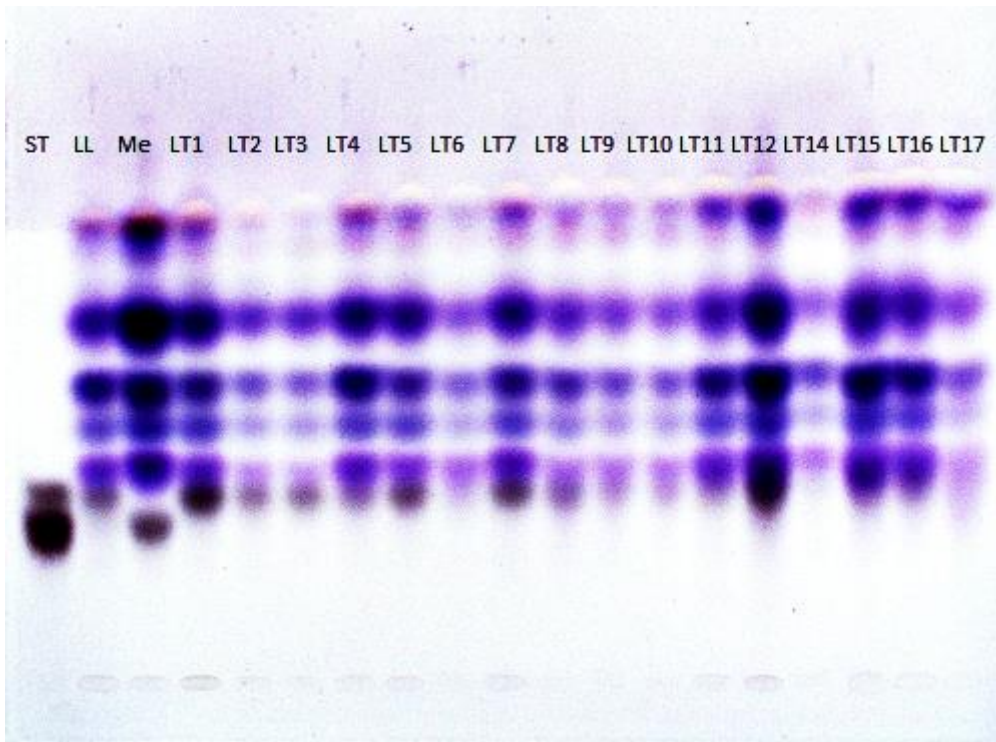


Figura 16. Cromatografía en capa fina de L-DAP de las cepas Lt1-Lt17. ST: estándar, LL: isómero L-DAP, Me: isómero Meso-DAP.

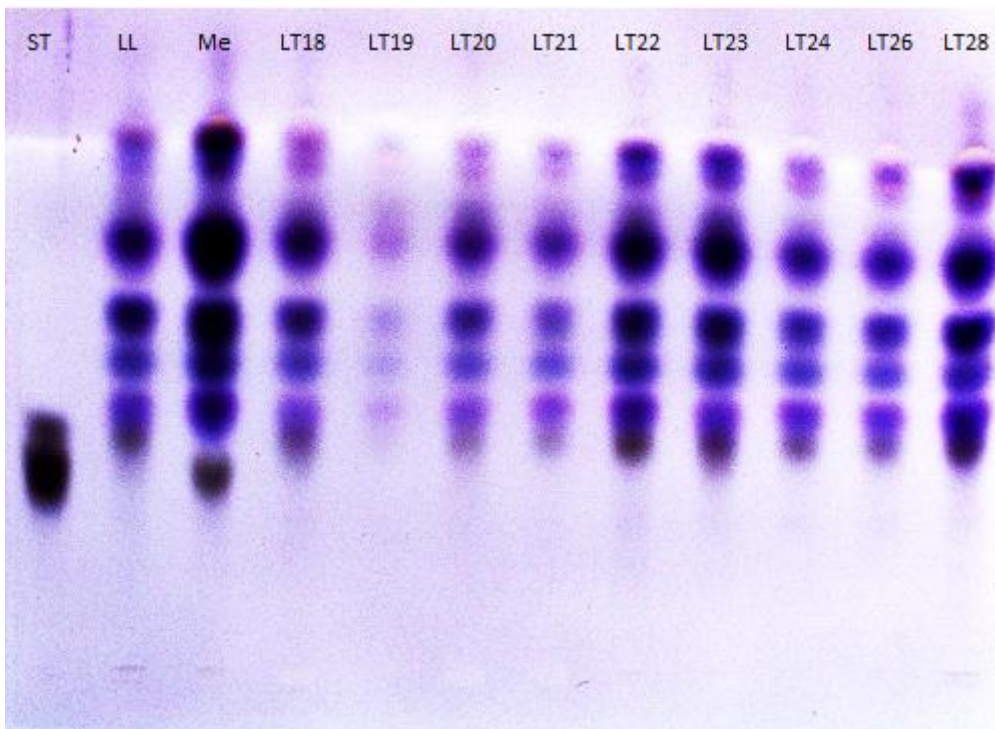


Figura 17. Cromatografía en capa fina de L-DAP de las cepas Lt18-Lt28. ST: estándar, LL: isómero L-DAP, Me: isómero Meso-DAP.

## DISCUSIÓN

---

En el desarrollo de técnicas de aislamiento de Actinobacterias, al igual que para otras bacterias -particularmente las gram-positivas-, se han propuesto ciertos pretratamientos en virtud de las características que presentan, como la producción de esporas resistentes a agentes físicos y, en algunos casos, químicos. Es importante asimismo considerar las condiciones intrínsecas de cada microambiente muestreado y los filtros llamados medios de cultivo y/o pretratamientos. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue aportar información que facilite el aislamiento y conocimiento de las Actinobacterias en la laguna de Términos, México.

Como se mencionó anteriormente, las colonias aisladas fueron obtenidas en mayor número de los sitios que corresponden a la Boca del Estero y al sitio Bahamitas (ubicados al oeste), donde las condiciones que se presentaron en el momento del muestreo fueron más homogéneas: por ejemplo, una salinidad promedio de 35.5 UPS, con mínimo de 33.1 y máximo de 38.2 UPS. Una temperatura promedio de 28°C y un pH alrededor de 8. En un trabajo con análisis de sedimentos, Duncan y colaboradores (2014) se dieron a la tarea de comparar la composición taxonómica de 8 diferentes sedimentos muestreados y apuntan que la composición del sedimento puede influir la composición de las comunidades bacterianas. En nuestro caso no se realizó el análisis físico-químico de la composición del sedimento -como granulometría, composición química, pH y materia orgánica-; sin embargo, es notoria la diferencia a simple vista de la composición de nuestros sedimentos muestreados y existe una similitud de los sitios Boca del Estero y Bahamitas (Apéndice 2, Figuras C y D). Se sabe que no sólo la composición geoquímica puede contribuir a la estructura de las comunidades microbianas presentes en una muestra ambiental, sino que éstas, a su vez, tienen un efecto, nada despreciable, en el ambiente. En este sentido, Gontang *et al.* (2007) mencionan que las bacterias gram positivas tienen la capacidad de alterar químicamente su ambiente, incluso en forma de esporas; un ejemplo de esto queda en evidencia por su capacidad para oxidar metales.

Uno de los factores en la aparición, así como la dispersión de diferentes bacterias en diversos sitios, se atribuye a las características morfológicas de los organismos, es decir, que cada organismo tiene sus propias características que le facilitan establecerse en algún ambiente particular, por ejemplo Jensen *et al.* (1991)

reportaron que, en ambientes marinos, hay predominancia de estreptomicetos en sistemas con poca profundidad, y un aumento en cantidad del género *Actinoplanes* al aumentar la profundidad. Esto podría ser explicado debido a que las esporas hidrofílicas del género *Micromonospora* se separan y dispersan más fácilmente en el agua que las cadenas de esporas hidrófobas del género *Streptomyces* (Williams *et al.*, 1984). Así también de un factor muy importante como es la salinidad, que se retomará más adelante.

Tomando en cuenta que las bacterias, como cualquier otro organismo, se encuentran interactuando con el ambiente y otros microorganismos hasta llegar a desarrollar consorcios microbianos y formar microambientes con señalizaciones bioquímicas (Harrison *et al.*, 2006). Al respecto, reportes de Oskay y colaboradores (2004) señalan que la diversidad de Actinobacterias en el suelo podría estar influenciada por la diversidad de especies de plantas que se encuentren en el mismo, ya que tanto las plantas como las Actinobacterias producen determinados metabolitos; de igual manera podría suceder en los sedimentos. Donde el entorno predetermina las especies que se instalan, un ejemplo muy claro sería la profundidad o la vegetación que, en nuestro caso, se trataría de un Manglar. Sin embargo, como ya se ha mencionado, son varios factores concurrentes a considerar y que complican esta trama.

El medio “3” -compuesto de Triptona, Casitona y Glucosa- se puede considerar como rico en nutrientes, y nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Gontag *et al.* (2007), ya que se obtuvo un mayor número de aislados en medios ricos. Sin embargo, estudios previos sugieren que los medios con nutrientes en porciones bajas mejoran el aislamiento y la recuperación inicial de diversos microorganismos raros, ya que ayudan a evitar la contaminación y sobrecrecimiento de cepas de crecimiento rápido como *Streptomyces* (Crawford *et al.*, 1993, Connon *et al.*, 2002). Al igual que ellos, este trabajo se apoya en la misma idea, debido a que las dos únicas cepas aisladas del medio 1 (medio oligotrófico) fueron LT58 y LT63, pertenecientes al morfotipo “*Micromonosporaceae*”, con características distintivas, sin embargo, aunque no podemos afirmar que éstas sean cepas nuevas, debido a que no contamos con los resultados de ADN para hacerlo.

Mincer y colaboradores (2002) realizaron un aislamiento con medios enriquecidos y pobres en nutrientes y reportaron, de un total de 112 sedimentos colectados, que 53 de ellos produjeron colonias con morfología característica de *Micromonosporaceae*,

reconocidas por su falta de hifas aéreas y pigmentación característica, que variaron de brillante a pálido naranja y a negro en medios ricos y la producción frecuente de un micelio sustrato muy extendido, cuando se cultiva en los medios de bajos de nutrientes.

Anteriormente se ha observado que los pretratamientos del sedimento (diluciones seriales, estampado en placa o aplicación de calor) pueden influir en la recuperación de cepas y sobreestimar la abundancia de las cepas que realmente son metabólicamente activas en el medio marino, pues no se diferencia entre aquellas que se encuentran en estado latente (Becerril-Espinosa *et al.*, 2012). Por lo tanto, se debe considerar que el número total de Actinobacterias aisladas corresponde a la fracción cultivable de éstas, en las muestras de sedimento y a aquellas que resultaron metabólicamente activas bajo las condiciones de cultivo utilizadas (Takizawa *et al.*, 1993, Connon *et al.*, 2002).

Teniendo en cuenta lo anterior, los resultados obtenidos mostraron que la técnica de estampado tuvo un porcentaje mucho mayor de aislamiento que la de dilución, lo que concuerda con lo reportado por Gontag *et al.* (2007), en relación a que el método de estampado resultó ser de gran éxito para cultivar bacterias gram-positivas, aparte de que la mayoría de los aislados pertenecen al grupo Micromonosporaceae, así como de otros taxones nuevos. De igual manera, Jensen y colegas (2005), usaron varias técnicas en combinación con algunos pretratamientos, resultando el estampado como la técnica con la obtención de mayor número de aislados. Lo mismo parece haber ocurrido en este trabajo, dado que por estampado fueron obtenidos 30 aislados, mientras que por dilución se detectaron 15. Sin embargo, de estos 30, 26 pertenecen a “Streptomycetaceae” y el resto al grupo “Micromonosporaceae”, precisamente el grupo al que iba dirigido este tipo de técnica. Por lo anterior, se podría apuntar que en Laguna de Términos, posiblemente domine mayormente el grupo de morfología “Streptomycetaceae”, y se encuentra menos representado el grupo Micromonosporaceae.

Los conteos de Actinobacterias oscilaron entre un mínimo de  $3 \times 10^3$  y un máximo de  $1 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>; comparando con la bahía de Chesapeake (Takizawa *et al.*, 1993, con conteos de  $1,4 \times 10^5$  a  $1,8 \times 10^2$  UFC mL<sup>-1</sup> en sedimento), vemos que la Laguna de Términos se encuentra dentro de este intervalo. Siendo lagunas costeras, se pensaría que estos dos ambientes son “similares”, mientras que en suelos agrícolas las abundancias reportadas van de  $9,8 \times 10^6$  a  $8,0 \times 10^7$ , con el método de conteo en

placa (Jeffrey 2008). Notablemente, los conteos de las lagunas costeras son menores a los encontrados en sistemas terrestres. Sin embargo, es importante dentro de ambientes de reciclamiento de la materia orgánica.

Según Rodríguez y Suescún (2013), la hibridación *in situ* se utiliza en los casos en que los microorganismos por estudiar resultan difíciles o imposibles de cultivar, como en el caso de las bacterias que requieren exigencias nutricionales y ambientales que los medios de cultivo no les proporcionan, o cuando en la muestra, el material por evaluar es insuficiente. A pesar de ello, la especificidad de los cultivos puede sesgar los conteos en las muestras. Así que podemos decir que las CFU (Unidades Formadoras de Colonias, por sus siglas en inglés) pueden considerarse una estimación aproximada del número de Actinobacterias, y -en todo caso- nos permite detectar su presencia en forma aceptable y confiable.

En la Laguna de Términos, el máximo de los conteos se registró en la Boca del Estero, comparando con los reportes de la Bahía de Chesapeake (EUA), en donde los recuentos más bajos se registraron en la boca de la bahía y en alta mar, sin embargo, no lo atribuyen a la temporalidad de la Bahía ya que observaron cambios constantes en las estaciones, por nuestra parte, no podemos hacer este tipo de inferencias en el presente estudio, puesto que solo se realizó en una sola fecha el muestreo.

De acuerdo a la morfología y a la composición de la pared celular indicada en la cromatografía de capa fina, se puede decir que los aislados que presentamos en el grupo “Streptomycetaceae” pertenecen a esta familia y muy probablemente al género *Streptomyces* o *Streptacidiphilus*, ya que estos dos comparten la estructura de pared tipo I. Sobre esto, estudios anteriores sobre Actinobacterias, puntualmente del género *Streptomyces*, reportan una alta abundancia en sitios cercanos a la costa, atribuyéndola a una influencia terrígena (Jensen *et al.*, 1991, Takizawa *et al.*, 1993). Aunado con lo sabido, que representantes terrestres del género *Streptomyces* tienen una alta tolerancia a ambientes salinos. Dadas estas características hacen referencia a su adaptación para vivir tanto en ambientes costeros, donde el gradiente de salinidad puede variar ampliamente, a diferencia de ambientes marinos, donde los valores de salinidad tienden a ser más constantes (Jensen *et al.*, 1991, Mincer *et al.*, 2002).

Del mismo modo, en un estudio realizado por Maldonado *et al.* (2005a) en muestras de sedimento profundo en la Fosa de Japón, en la Cuenca el Canario, y de ciertos



fiordos en Noruega, de donde se reportó el aislamiento de los géneros *Actinomadura*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardiopsis*, *Pseudonocardia*, *Saccharopolyspora*, *Strepto-sporangium*, *Nonomuraea*, *Verrucosipora* y *Williamsia*. Como se puede observar no se obtuvieron alguno de los tres géneros *Micromonospora*, *Rhodococcus* o *Streptomyces*, que por mucho tiempo se habían considerado ubicuos.

Con lo mencionado anteriormente podemos decir que estos tres géneros, son importantes en ambientes propiamente costeros dadas las condiciones fluctuantes de las lagunas costeras de barra, como la salinidad, mareas, aportes terrígenos y de agua dulce. Sin embargo, las diferencias en la abundancia y distribución de las cepas recuperadas en este estudio, no podemos considerarla como general para este tipo de ambientes, se sugiere ampliar el muestreo, además de aplicar otras formas de detección de organismos reportados, como procedimientos cultivo-independientes.

Dado que algunas de las cepas aisladas en el presente trabajo, tienen cierta tendencia a tener un buen desarrollo en condiciones donde las sales marinas estaban presentes, hace pensar la importancia de estas en su desarrollo.

Observamos una baja en el crecimiento colonial de las cepas aisladas en este estudio, pudiéndose notar en un decaimiento en la biomasa desarrollada en los medios que no contenían agua marina. Para la discusión sobre esto, es muy importante tomar en cuenta los diferentes escenarios que implican este tipo de métodos utilizados, como ya lo hemos mencionado reiteradas veces en este capítulo, dada la especificidad o la inespecificidad en las condiciones del cultivo que favorecen el establecimiento de las cepas en estado latente -esporas-. Incluso que la capacidad de crecer en un medio a base de agua de mar, no es una indicación de que una cepa sea metabólicamente activa en el medio marino, ya que hay actinomicetos no marinos conocidos por su tolerancia a las sales (Okazaki y Okami, 1975).

Por lo que en este estudio, no podemos afirmar que estas sean en forma de esporas o vegetativas, lo que si podemos mencionar es el potencial, de algunas Actinobacterias, de crecer en un ambiente marino, eventualmente con la condiciones ambientales adecuadas.

Se ha discutido ampliamente sobre la validez del procedimiento de cultivo, principalmente en relación con el aislamiento que se da por la germinación de esporas (estado latente) y no por el establecimiento de colonias de origen

vegetativo de estos grupos. En el caso de *Streptomyces*, Morán y colaboradores (1995) explican que, -a través de hibridaciones rigurosamente controladas de ARN extraído de sedimentos de una marisma costera, además de una extracción de ARN vegetativo de *Streptomyces*, con la sonda específica del género *Streptomyces*- que lo que se hibrida procede de la parte vegetativa, lo que indica que las esporas no son la fuente de la señal de hibridación y por lo tanto, infieren que también lo que se cultiva, en principio, es vegetativo. El ARNr extraído, que corresponde al género *Streptomyces*, representó del 2 al 5% del ARNr de la comunidad total de los sedimentos. Además que *Streptomyces* aumenta su abundancia relativa en respuesta a la disponibilidad de ciertos sustratos (como ácido vanílico y ácido succínico), pero no muestran cambiar con otros (es decir, lignocelulosa, insulina y glicerol). El ácido vanílico es un sustrato relacionado con la lignina, de modo que una respuesta positiva aumento de abundancia de la población (crecimiento, podría ser visto como evidencia de la participación de poblaciones de *Streptomyces* en el proceso de la degradación de la lignina.

Bajo estos criterios la alta abundancia de cepas tipo *Streptomyces* en ambientes estuarinos, puede ser de origen terrestre, confirmando con su tolerancia a los cambios de salinidad, que se presentan en la Laguna de Términos, aunado a las características de este género como mineralizadoras y recalcitrantes ya que pueden degradar sustancias resistentes como compuestos aromáticos, látex, lignina, pectina, queratina y quitina (Prescott et al., 1999), siendo así más razonable y justificable su predominancia en ambientes de depuración.

En este trabajo, se puede distinguir la producción de pigmentos difusibles así como de pigmentos melanoideos, en cada uno de los medios probados, como ya se ha mencionado han sido estandarizados en años anteriores (Shirling y Gotbliet 1960)

Se han encontrado pigmentos distintos a los melanoideos, éstos se pueden encontrar en los medios ISP que no contienen tirosina, así como en medios altamente orgánicos. Tonos amarillos, pigmentos rojos, azules o violetas en el medio, pueden ser importantes en la clasificación, en nuestro caso observamos tonos que van de los amarillezcos, rojizos hasta cafés.

Por otro lado el tipo de cepa que produce pigmento oscuro (melanoide) en medios que contienen una fuente de tirosina como los que se usaron en este trabajo, ISP-6 e ISP-7 (Agar peptona-hierro y Agar tirosina), tiene una alta posibilidad de tener esta propiedad, ya que el medio Agar peptona-hierro se utiliza como un sensible

indicador de la melanina en la reacción de la tirosinasa o polifenol oxidasa. En este medio la producción de melanina es rápida y una positiva reacción es evidente en 2-4 días. Cabe señalar, sin embargo, que el oscurecimiento de este medio a veces puede resultar de la producción de HS o la producción de pigmentos distintos de la melanina en el medio.

El oscurecimiento del medio Agar tirosina es una evidencia más definitiva de la producción de melanina cierto, aunque tiene algunos inconveniente, en ciertas ocasiones el crecimiento es deficiente y no es lo suficientemente sensible para algunas cepas. En lo que concierne a nuestros resultados las cepas LT19, LT24 y LT28 fueron las cepas que mostraron un oscurecimiento en el medio ISP-7 o Agar tirosina, por lo que podríamos mencionar que estos aislados producen algún producto melanoide.

El oscurecimiento del medio Triptona-extracto de levadura (ISP 1) también confirma reacciones melanina positivas de los observados en peptona-levadura-hierro agar. Sin embargo, no hubo coincidencias dado que en Triptona-levadura, las cepas reaccionantes fueron LT10 y LT12, mientras que en el medio Agar peptona-hierro que obtuvieron un oscurecimiento fueron LT 1, 3 y 12. Porque solo la cepa LT12 tuvo una reacción positiva en dos medios de tres, entonces podríamos decir que esta cepa es la única que produce algún pigmento melanoide. El término melanoide, tal como se utiliza aquí, denota un pigmento oscuro, que puede o no puede ser reacción de una tirosinasa o polifenol-oxidasa.

## CONCLUSIONES

---

- Las 45 cepas aisladas corresponden a dos grupos importantes, según sus características macro-morfológicas: Streptomycetaceae y Micromonosporaceae. Confirmando con los resultados de quimiotaxonomía, se puede decir que las cepas, del grupo con morfología de tipo *Streptomyces*, pertenecen a la familia Streptomycetaceae.
- El pretratamiento Estampado ha resultado ser un buen método en la recuperación de Actinobacterias, un cincuenta por ciento más, que con el de dilución. Sin embargo, con métodos como la dilución, se observó un mayor número de cepas diferentes.
- Para un aislamiento eficiente en cuanto al número de aislados, se sugiere tomar en cuenta el medio tres, conformado por triptona, casitona y glucosa, considerado como un medio enriquecido. Mientras que para un aislamiento de cepas raras, se pueden aplicar algunas restricciones nutricionales.
- Los sitios con mayor número de cepas aisladas se localizó en la Boca del estero y en Bahamitas puntos geográficamente contiguos, y con similitudes en la estructura del sedimento.
- Los datos de abundancia en la Laguna de Términos nos hacen realizar una comparación entre ambientes costeros y ambientes terrestres abundantes como ejemplo los campos de cultivo. Colocando a la laguna como una fuente importante de Actinobacterias.
- El desarrollo de los aislados en los medios, es variable, presentando diferentes grados de crecimiento en condiciones salinas. Reconociendo que algunas de ellas tienen amplios rangos de tolerancia a sales marinas.
- La predominancia de los géneros *Streptomyces* y *Micromonospora* en ambientes terrestres así como de zonas costeras se confirma debido a que el muestreo se realizó principalmente en un estero el cual forma parte de una laguna costera de barra, y hay una influencia considerable fluvial, donde se dan procesos de mineralización de la materia orgánica.

## REFERENCIAS

---

Albarracín V H, Amoroso M J, y Abate M C. 2005. Isolation and characterization of indigenous copper-resistant actinomycete strains. *Chem. Erde.* 65: 145-156.

Amann R I, Ludwig W, y Schleifer K H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143-169.

Anderson A S, y Wellington E M H. 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 797-814.

Becerril-Espinosa A, Guerra-Rivas G, Ayala-Sánchez N, y Soria-Mercado IE. 2012. Antitumor activity of actinobacteria isolated in marine sediment from Todos Santos Bay, Baja California, Mexico. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 47: 317-325.

Baldacci E. 1939. Contributo alla Sistematica degli Attinomiceti. V - *A. albus*. *Atti 1st. Bot. Univ. Pavia.* 11:192-215

Colquhoun J A, Mexson J, Goodfellow M, Ward A C, Horikoshi K, y Bull A T. 1998. Novel rhodococci and other mycolate actinomycetes from the deep sea. *Antonie van Leeuwenhoek.* 74: 27-40.

Connon S, y Giovannoni S. 2002. High-Throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3878-3885.

Crawford D L, Lynch J M, Whipps M J, y Ousley M. 1993. Isolation and characterization of Actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3899-3905.

Curtis T P, Sloan W T, y Scannell J W. 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:10494-10499.

Denisova L Y, Bel'kova N L, Tulokhonov I, y Zaichikov E F. 1999. Bacterial diversity at various depths in the southern part of Lake Baikal as revealed by 16S ADNr sequencing. *Mikrobiologiya*. 68:475-483.

Dunbar J S, Barns M, Ticknor L O, y Kuske C R. 2002. Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3035-3045.

Duncan K, Haltli B, Gill K, y Kerr R. 2014. Bioprospecting from Marine Sediments of New Brunswick, Canada: Exploring the Relationship between Total Bacterial Diversity and Actinobacteria Diversity. *Mar. Drugs*. 12: 899-925.

Fiedler H P, Bruntner C, Bull A T, Ward A C, Godfellow M, Potterat O, Pudar C, y Mihm G. 2005. Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 87: 37-42.

FIR. Ficha Informativa de los Humedales de Ramsar: Área de Protección de Flora y Fauna Laguna de Términos. 2003. <[http://ramsar.conanp.gob.mx/docs/sitios/FIR\\_RAMSAR/Campeche/APFF\\_Laguna\\_de\\_Terminos/Laguna%20de%20T%C3%A9rminos.pdf](http://ramsar.conanp.gob.mx/docs/sitios/FIR_RAMSAR/Campeche/APFF_Laguna_de_Terminos/Laguna%20de%20T%C3%A9rminos.pdf)> (13 Feb.2013).

García-Miranda E. 1973. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen, México, D.F., UNAM. 246p.

Glöckner F O, Zaichikov E, Belkova N, Denisova N, Pernthaler A, y Amann R. 2000. Comparative 16S rRNA analysis of Lake Bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5053-5065.

Gomez-Reyes E, Vázquez-Botello A, Carriquiry J, y Buddemeier R. 1977. Laguna de Términos, Campeche. LOICZ. <<http://data.ecology.su.se/MNODE/mexicanlagoons/ltbud.htm>> (25 Marz.2013).

Goodfellow M, Haynes J A. 1984. Actinomycetes in marine sediments. In: Ortiz-Ortiz L., Bojalil L.F. and Yakoleff V. (eds), Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes. Academic Press, Orlando, pp. 453-472.

Goodfellow M. 1989. Suprageneric classification of the actinomycetes. En; S.T. Williams, Sarpe, M. and Holt G. Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology 1989; Vol. 4. Williams and Wilkins, Baltimore, p.2333-2339.

Harrison J, Raymond J, Turner L, Marques L, y Howard C. 2006. Biopelículas. Cortesía de los autores < <http://amscimag.sigmaxi.org/4Lane/ForeignPDF/2005-11CeriSpan.pdf>> (15 Jun.2015).

Hiltner L, y Störmer K. 1903. Studien über die Bakterienflora des Ackerbodens, mit besonderer Berücksichtigung ihres Verhaltens nach einer Behandlung mit Schwefelkohlenstoff und nach Brache. Arb Biol Reichsanst Land, Forstwirtsch Berl-Dahlem. 3:443-545.

Hirano S, Kato J-Y, Ohnishi Y, y Horinouchi S. 2006. Control of the *Streptomyces subtilisin* inhibitor gene by AdpA in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. J. Bacteriol. 188: 6207-6216.

Hirsch P, Mevs U, Kroppenstedt R, Schumann P, y Sakebrandt E. 2004. Cryptoendolithic Actinomycetes from Antarctic sandstone rock sample: *Micromonospora endolithica* sp. nov. and two isolates related to *Micromonospora caerulea* Jensen 1932. Int. Syst. Appl. Microbiol. 27: 166-174.

Hugenholtz P, Goebel B, y Pace N. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. J. Bacteriol. 180: 4765-4774.

Jeffrey L S. 2008. Isolation, characterization and identification of actinomycetes from agriculture soils at Semongok, Sarawak. AJB, pp 3697-3702.

Jensen P R, Dwight R, y Fenical W. 1991. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. Appl. Environ. Microbiol. 57:1102-1108.

Jensen P R, Gontang E, Mafnas C, Mincer J T, y Fenical W. 2005. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environ. Microbiol.* 7: 1039-1048.

Jensen P R y Lauro F M. 2008. An assessment of actinobacterial diversity in the marine environment. *A van. Leeuw. J. Microb.* 94:51-62.

Kampfer P. 2012. The Actinobacteria. In: Whitman W, Perte A, Goodfellow M, Kâpmfer P, Busse H G, Trujillo M, Ludwing w, Susuky K (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 25-1448.

Kim S B, Lonsdale J, Seong C N, y Goodfellow M. 2003. *Streptacidiphilus* gen. nov., acidophilic actinomycetes with wall chemotype I and emendation of the family Streptomycetaceae (Waksman & Henrici (1943) <sup>AL</sup>) emend. Rainey *et al.* 1997. *Antonie Van Leeuwenhoek* 83: 107-116.

Korn W F y Kutzner H J. 1992. The Family Streptomycetaceae. In Balows, Trüper HG., Dworkin M., Harder W and Schleifer K.H (eds). *The Prokaryotes*. SpringerVerlag Vol I. 921-995.

Kunisawa T. 2007. Gene arrangements characteristic of the phylum *Actinobacteria*. *Antonie van Leeuwenhoek* 92: 359–365.

Lane D J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, New York, pp. 115.

Lazzarini A, Cavaletti L, Toppo G, y Marinelli F. 2000. Rare genera of Actinomycetes as potential producers of novel antibiotics. *Ant Van Leeuwenhoek*. 78: 399-405.

Lechevalier M, y Lechevalier H. 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* 20: 435-443.



Lozupone C A, y Knight R. 2007. Global patterns in bacterial diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104:11436-11440.

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.

Maldonado L, Stach J E M, Pathom-aree W, Ward A C, Bull A T, Goodfellow M. 2005b. Diversity of cultivable Actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 87:11-18.

Maldonado L, Fragoso-Yáñez D, Pérez-García A, Rosellón-Druker J, y Quintana E. 2009. Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 95: 111-120.

Maldonado L, Stach J, Ward A, Bull A, y Goodfellow M. 2008. Characterization of micromonosporae from aquatic environments using molecular taxonomic methods. *Antonie van Leeuwenhoek.* 94: 289-298.

Mancilla P M y Vargas F. 1980. Los primeros estudios sobre la circulación y el flujo neto de agua a través de la laguna de Términos, Campeche, México. *An. Centro Cienc del Mar y Limnol. UNAM.* 7: 1-12.

Mincer T J, Jensen P R, Kauffman C A, y Fenical W. 2002. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 5005-5011.

Moran M-A, Rutherford L, y Hodson R. 1995. Evidence for Indigenous *Streptomyces* populations in a marine environment determined with a 16S rRNA probe. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3695-3700

Okazaki T y Okami Y. 1976. Studies on actinomycetes isolated from shallow sea and their antibiotic substances, p. 123–161. In T. Arai (ed.), *Actinomycetes, the boundary microorganisms*. Toppan Co. Ltd., Tokyo.

Orskov J. 1923. *Investigation into the morphology on the Ray Fungi*. Copenhagen: Levin y Munksgaard.

Prescott M L, Harley P J, y Klein A D. 1999. *Microbiología*. Mc Graw Hill Interamericana, Madrid, España, pp. 525-537.

Prescott M L, Harley P J, y Klein A D. 2002. *Microbiología*. Mc Graw Hill Interamericana, Madrid, España, pp.520-569.

Pridham G, and Tresner D. 1974. Family VII. Streptomycetaceae Waksman and Henrici 1943, 339. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th edn, pp. 747-748. Edited by R. E. Buchanan and N. E. Gibbons. Baltimore: Williams & Wilkins.

Quintana ET, Wierzbicka K, Mackiewicz P, Osman A, Fahal AH, Hamid ME, Zakrzewska-Czerwinska J, Maldonado LA, and Goodfellow M. 2008. *Streptomyces sudanensis* sp. nov., a new pathogen isolated from patients with actinomycetoma. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 93: 305-13.

Sanz-Lopez A. 2005. *Aislamiento y caracterización de genes de la ruta biosintética de un antifúngico oxopentaeno producido por Streptomyces sp.* Tesis (Doctoral) Madrid, España. Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), p. 178.

Shirling B, and Gottblid D. 1960. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* 16: 313-340.

Stach J E M, Maldonado L A, Masson D G, Ward A C, Goodfellow M, Bull A T. 2003. New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. *Environ. Microbiol.* 5:828–841.

Staneck J L, Roberts G D. 1974. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl Microbiol.* 28:226-231.

Stackebrandt E, y Woese C R. 1981. Towards a phylogeny of the actinomycetes and related organisms. *Current Microbiology.* 5: 131-136

Stackebrandt E, Rainey F A, y Ward-Rainey NL. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria classis nov.* *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:479-491.

Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont P, Kämpfer P, Maiden M C, Nesme X, Rosselló-Mora R, y Swings J. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52: 1043-1047.

Takizawa M, Colwell R, Hill R. 1993. Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 997-1002.

Waksman A S, and Henrici T A. 1943. The nomenclature and classification of the Actinomycetes. *J. Bacteriol.* 46: 337-341.

Weyland H. 1969 . Actynomecetes in North Sea in Atlantic Ocean sediments. *Nature.* 223; 858.

Wildermuth H. 1969. Development and organization of the aerial mycelium in *Streptomyces coelicolor*. *J. gen. Microbiol.* 60: 43-50.

Williams ST, Lanning S, and Wellington EMH. 1984. Ecology of actinomycetes. In *The Biology of the Actinomycetes.* eds. M Goodfellow, M Mordarski, and ST Williams, Academic Press, London, pp. 481-528

Williams S T, Goodfellow M, Alderson A. 1989. Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339AL. In: Williams ST, Sharpe ME, Holt JG (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 2452-2492.

Woese C R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221-271.

Xu L H, Li Q R, Jiang C L. 1996. Diversity of aquatic Actinomycetes in lakes of the Middle Plateau, Yunnan, China. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 249-253.

Yañez C A. 1963. Batimetría, salinidad, temperatura y distribución de los sedimentos recientes en la laguna de Términos, Campeche, México. *Bol. Inst. Geol. UNAM.* 67: 1-47.

Zhang Z, Wang Y, and Ruan J. 1997. A proposal to revive the genus *Kitasatosporia* (Omura, Takahashi, Iwai and Tanaka 1982). *Inter. J. Syst. Bacteriol.* 47: 1048-1054.

Zwart L, Crump B C, Agterveld M P K V, Hagen F, and Han S K. 2002. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat. Microb. Ecol.* 28:141-155.

APÉNDICE 1

Crecimiento de los 20 aislados LT1, LT2, LT3, LT4, LT5, LT6, LT7, LT9, LT10, LT11, LT12, LT14, LT15, LT16, LT17, LT19, LT21, LT23, LT24, LT28, en 7 medios ISP.

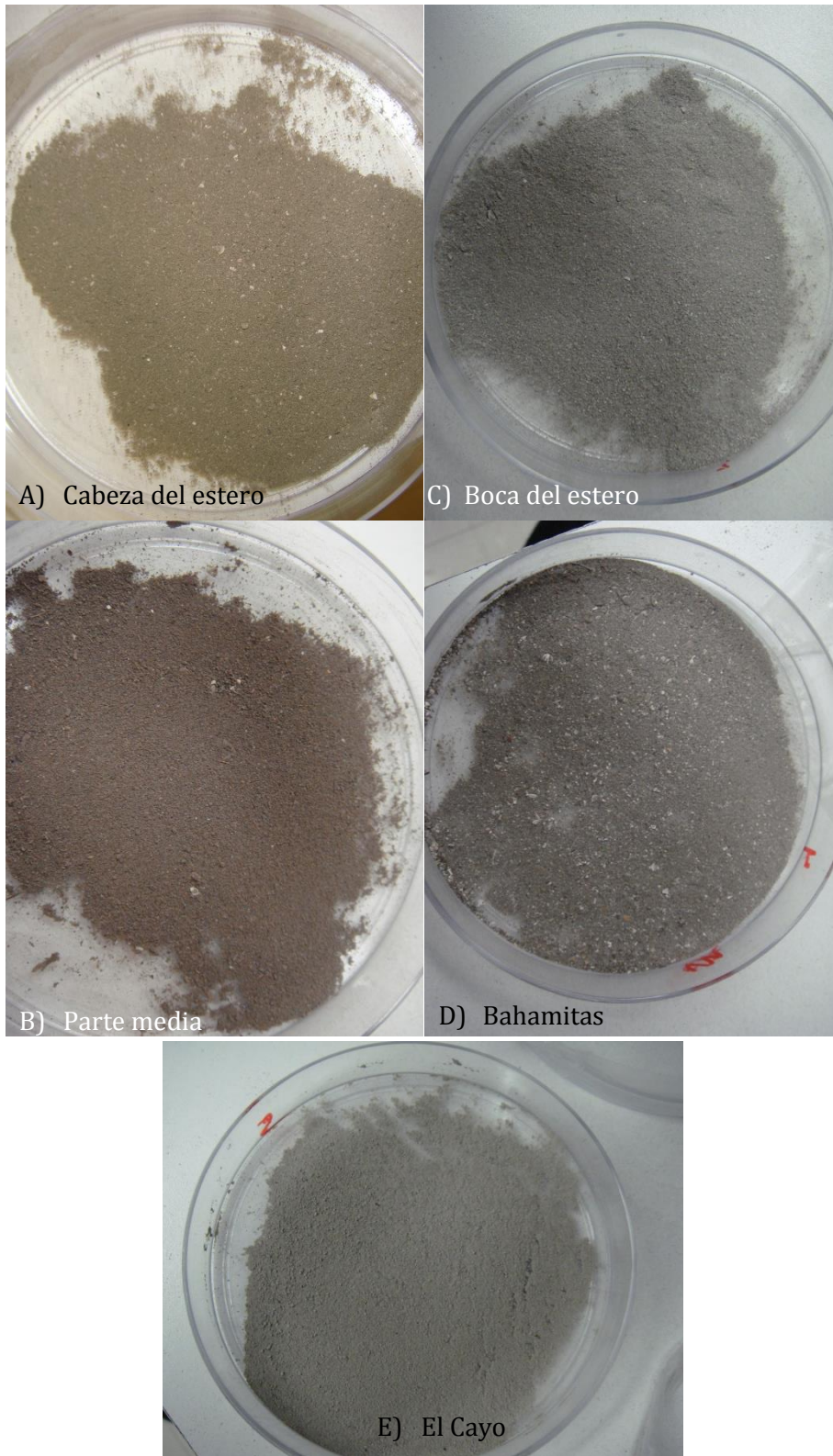
	LT1	LT2	LT3	LT4	LT5	LT6	LT7	LT9	LT10	LT11
ISP 1										
ISP 2										
ISP 3				N.C	N.C					
ISP 4										
ISP 5				N.C						
ISP 6										
ISP 7										

	LT12	LT14	LT15	LT16	LT17	LT19	LT21	LT23	LT24	LT28
ISP 1					CNT			CNT	CNT	CNT
ISP 2										CNT
ISP 3										
ISP 4			N:C	N:C						
ISP 5										
ISP 6		N:C	N:C	CNT	CNT		CNT	CNT	CNT	CNT
ISP 7										

## APÉNDICE 2

---

Sedimentos recolectados en Mayo de 2013 en la Laguna de Términos.



## APÉNDICE 3

### Medios utilizados

#### ISP-1

##### Triptona-Extracto de Levadura

Triptona (Difco)	5g
Extracto de levadura	3g
Agua destilada	1L
pH	7 a 7.2

#### ISP-2

##### Extracto de Levadura-Extracto de Malta

Extracto de Levadura	4g
Extracto de Malta	10g
Dextrosa	4g
Agua destilada	1L

#### ISP-3

##### Agar-avena

Avena	20g
Agar	18g
Calentar el avena en 1L de agua, filtrar	
Añadir agua y llegar 1L, añadir 1mL de sales. Ajustar a pH 7.	

#### ISP-4

##### Sales inorgánicas-Almidón agar

\*Sol.1 Almidón soluble 10g, hidratar Y llevar a 500mL.  
\*Sol.2 K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g; Mg SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1g; NaCl 1g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 2g; CaCO<sub>3</sub> 2g; Agua destilada 500mL y sales traza 1mL  
\*Mezclar sol. 1 y 2, añadir 20g de Agar pH 7-7.4

#### ISP-5

##### Glicerol-Agar Aspargina

L-Aspargina	1g
Glicerol	10g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhidro)	1g
Sol. de sales traza	1mL
Agua destilada	1L
Agar	20g
pH	7 a 7.4

#### ISP-6

##### Peptona-Hierro Agar

Peptona Hierro Agar deshidratado	36g
Extracto de Levadura	1g
Agua destilada	1L
pH	7 a 7.2

#### ISP-7

##### Agar Tirosina

Glicerol	15g
L-Tirosina	0.5g
L-Aspargina	1g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5g
NaCl	0.5g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01g

Agua destilada	1L
Sol. Sales traza	1mL
Agar	20g
pH	7.2-7.4