



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA

**Estudio de aislados marinos del género *Micromonospora* con la capacidad
de producir micelio aéreo.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
Maestría en Ciencias del Mar y Limnología

PRESENTA:

Wendy Marlen Lara González

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Alejandra Prieto Davo
SISAL, UNAM

Ciudad de México, septiembre 2016



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.

ÍNDICE

Resumen	1
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Importancia del Ambiente Marino y su diversidad microbiana	2
1.2. La clase <i>Actinobacteria</i>	4
1.2.1 <i>Actinobacterias</i> en el ambiente marino	6
1.3. La familia <i>Micromonosporaceae</i>	7
1.4. El género <i>Micromonospora</i>	7
1.4.1 Formación de micelio aéreo: Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i>	9
1.5. Reacción de cadena de la polimerasa	13
1.6. Gen 16S rRNA	14
2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	17
3. OBJETIVOS	
3.1. General	17
3.2. Particulares	17
4. HIPÓTESIS	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS	18
5.1. Aislados microbianos	19
5.2. Búsqueda de aislados capaces de producir MA	19
5.3. Extracción de ADN y electroforesis	20
5.4. PCR género <i>Micromonospora</i> y gen 16S	21
5.5. Análisis filogenético del <i>cluster ram</i>	23
5.6. Determinación de isómeros del ácido diaminopimélico	23
5.7. Estudio <i>in silico</i>	24

6. RESULTADOS	24
6.1. Aislados capaces de producir MA	25
6.2. Extracción ADN, PCR para género y 16S rRNA	26
6.3. Identificación por aproximación filogenética	28
6.4. Determinación del isómero del ácido diaminopimérico (DAP)	30
6.5. Estudio in <i>silico</i>	31
7. DISCUSIÓN	35
8. CONCLUSIONES	39
9. PERSPECTIVAS	40
10. BIBLIOGRAFÍA	41
11. APÉNDICES	45
11.1 Apéndice A: Medios de cultivo	45

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Árbol filogenético con base en secuencias del gen del 16S Ribosomal	4
2. Miembros del género <i>Micromonospora</i> mostrando los diferentes estadios de los cultivos	8
3. Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i>	11
4. Modelo de la biosíntesis del péptido surfactante sapB	12
5. Distribución de los genes implicados en la cascada extracelular para la formación de MA	13
6. Representación esquemática de un PCR	14
7. Operón del rRNA	15
8. Diseño experimental de la inoculación de los aislados en las cajas	20
9. Aislado BL-1 formación de micelio aéreo (MA)	25
10. Gel de agarosa del ADN	26
11. Gel del producto de PCR de género	27
12. Gel del producto de PCR del gen 16S rRNA	27
13. Árbol filogenético de secuencias del gen 16S del rRNA de los aislados	29
14. Cromatografía en capa fina de alta resolución (TLC) de los isómeros del DAP	30

ÍNDICE DE TABLAS

1. Origen de los aislados	19
2. Mezcla de reacción del PCR	22
3. Aislados capaces de producir MA	24

RESUMEN

La clase *Actinobacteria* se refiere a bacterias Gram positivas con un alto contenido de guanina y citosina en su genoma e incluye géneros de importancia económica y médica. Estas bacterias se encuentran ampliamente distribuidas en todos los ecosistemas, sin embargo, existe poca información acerca de su distribución y diversidad en ambientes nacionales tanto marinos como terrestres. Dentro de esta clase, se ha reportado al género *Micromonospora* como un componente microbiano usual de ambientes acuáticos.

En el presente trabajo, se estudiaron diferentes aislados presuntamente miembros del género *Micromonospora* obtenidos del Golfo de California, así como de Laguna de Términos. En primera instancia, se realizó una búsqueda de aislados capaces de producir micelio aéreo mediante pruebas de crecimiento en diferentes medios de cultivo a diferentes concentraciones de NaCl y sales marinas. Una vez localizados estos aislados se les extrajo el ADN para amplificar el 16S de ARN ribosomal con *primers* específicos del género y también mediante una prueba del ácido diaminopimélico.

Ambas pruebas confirmaron la identidad de los aislados y su pertenencia a este género bacteriano.

Como segunda aproximación al estudio de la formación de micelio aéreo, se buscó con herramientas bioinformáticas aquellos genes pertenecientes al *clúster* de formación de micelio aéreo en el género *Streptomyces*. En específico los genes del *clúster ram* fueron utilizados como aproximación para el estudio de los genomas de dos miembros del género *Micromonospora* filogenéticamente cercanos con los aislados ya descritos. Esto con el fin de determinar si hay genes similares a los de este *clúster* que sean responsables de la formación de micelio.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia del Ambiente Marino y su diversidad microbiana

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

Si tomamos en cuenta que la Tierra está cubierta en un 75% de agua, en su mayoría de los océanos, y en cada gota de agua existe 1×10^6 bacterias y entre el 90 y 98% de la biomasa del océano está constituida por microorganismos, no es difícil pensar que a la fecha existe una enorme cantidad de microorganismos desconocidos. (Sogin *et al.*, 2006).

El número total aproximado de células procariontas usando técnicas moleculares se estima en 1×10^{29} en los océanos y 1×10^{26} en sedimentos (Whitman *et al.*, 1998). Más aún, entre el 90 y 98% de la biomasa del océano está constituida por microorganismos (Sogin *et al.*, 2006) y en las últimas dos décadas se ha demostrado que los microorganismos desconocidos son el mayor reservorio de genes útiles para medicina y biotecnología, ya que pueden poseer metabolitos no descritos (Pedrós-Alió, 2006; Bull *et al.*, 2000; Maldonado *et al.*, 2009). En este sentido, el aislar especies microbianas metabólicamente adaptadas al ambiente marino (autóctonas) es de gran importancia para el estudio de la microbiología marina y su diversidad en el ecosistema (Mincer *et al.*, 2002; Maldonado *et al.*, 2005a).

Las bacterias marinas son organismos unicelulares microscópicos (<2 μm de longitud) que, según su clasificación nutricional, pueden dividirse en 4 grandes grupos: 1) quimioheterótrofo, que utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono y de energía; 2) quimioautótrofo, que utilizan compuestos inorgánicos reducidos como fuente de energía y carbono inorgánico como CO_2 como fuente de carbono; 3) fotoheterótrofo, que utilizan la luz como fuente de energía y compuestos orgánicos como fuente de carbono; 4) fotoautótrofos, que utilizan la luz como fuente de energía y el CO_2 como fuente de carbono (Kennish, 2001). Las bacterias aeróbicas (facultativamente anaeróbicas) heterótrofas se encuentran generalmente en la columna de agua (cuerpo de agua uniforme) ya sea flotando o adjuntas a partículas, en la capa superior de los sedimentos del suelo marino y/o en los tejidos de animales o plantas. Las bacterias anaeróbicas habitan en profundidades mayores, es decir, capas de sedimentos anóxicos, caracterizados por una pobre circulación o aquellas regiones muy contaminadas (Kennish, 2001).

Debido a las características particulares de los océanos tales como la salinidad (3.3% - 3.7%), pH (8 – 8.3), temperatura, y presión, por mencionar algunas, en la mayoría de los casos no siempre es posible recrear algunas de las condiciones del medio natural que permiten la mejor recuperación o aislamiento adecuado de microorganismos, esto, aunado a la dificultad de obtención de muestras por la poca accesibilidad al fondo oceánico, crea dificultades para monitorear la diversidad microbiana en los diferentes hábitats acuáticos si esta es estudiada utilizando las herramientas de la microbiología clásica. Por esta razón debe de considerarse que las técnicas tradicionales de muestreo y subsecuente cultivo deben ser constantemente complementadas con técnicas de ácidos nucleicos para así proporcionar nueva información con respecto a la diversidad de los microorganismos que existen en muestras oceánicas (Magarvey *et al.*, 2004; Mincer *et al.*, 2002; Maldonado *et al.*, 2005b; Sogin *et al.*, 2006; Gontang *et al.*, 2007; Maldonado *et al.*, 2009).

1.2. La clase *Actinobacteria*

La clase *Actinobacteria* fue propuesta en 1997 y está basada en el agrupamiento filogenético de la secuencia del 16S rADN/rRNA y la presencia de firmas nucleotídicas en taxones específicos del gen 16S rADN/RNA del grupo microbiano conocido hasta ese entonces de manera genérica como “*actinomicetos*”. Una vez establecida la posición evolutiva, el término: clase *Actinobacteria*, ha sido desde entonces utilizado para su denominación. (Stackebrandt *et al.*, 1992).

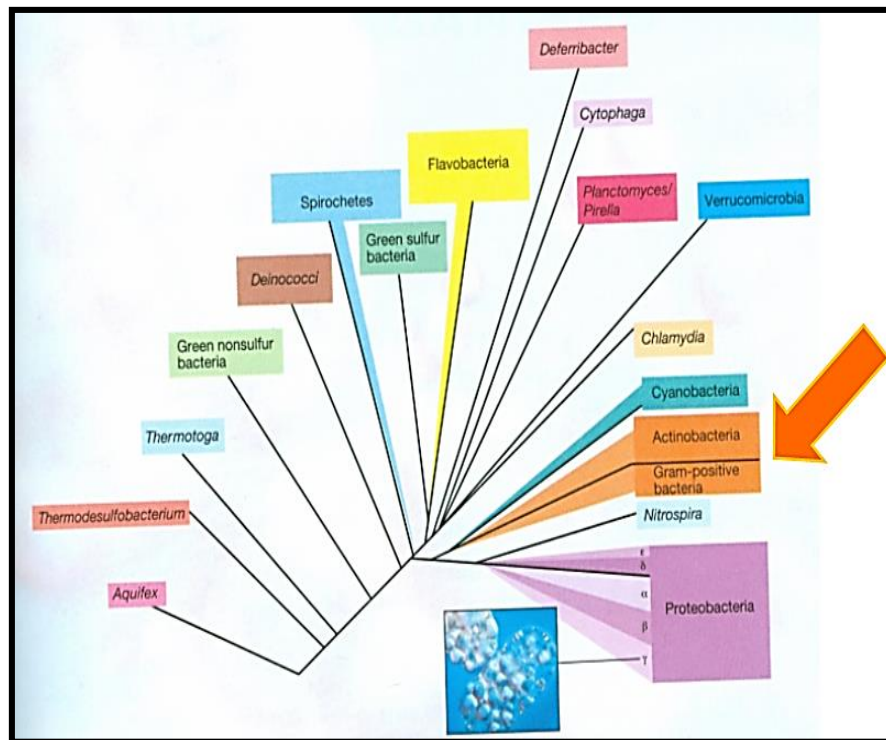


Figura 1. Árbol filogenético con base en secuencias del 16S ribosomal. La flecha indica la posición taxonómica de la clase *Actinobacteria* (Stackebrandt *et al.* 1992) dentro de las Eubacterias. Fuente: Ligeramente modificado por Lara González de Madigan & Martinko, 2006.

La clase *Actinobacteria* es un grupo extremadamente diverso que incluye diferentes familias, géneros y subórdenes. Por ejemplo, hasta marzo del 2016 esta clase comprendía 53 familias y 273 géneros (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). La gran mayoría de los géneros que comprende han sido aislados de fuentes terrestres ya que se consideraba a éste hábitat como su reservorio por excelencia. La presencia de estos géneros en otros hábitats, sobre todo marinos era, por consecuencia,

explicada en términos de una migración de las esporas de estos microorganismos hacia el mar (Bérdy, 2005). En la actualidad existe evidencia que indica que varias especies son autóctonas del ambiente marino, en particular aquellas pertenecientes al género *Salinispora* (Maldonado *et al.*, 2005a) y por lo tanto, presentan una serie de adaptaciones a este ecosistema. Evidentemente, el descubrimiento del género *Salinispora* ha contribuido a la apertura de una nueva era en el biodescubrimiento de microorganismos de la clase *Actinobacteria* en éste hábitat (Maldonado *et al.*, 2005a).

La clase Actinobacteria está constituida por bacterias Gram positivas con alto contenido de guanina-citosina [G-C] dentro de su ADN. La mayoría son aerobias y su morfología va desde bacilos cortos (por ejemplo, el género *Arthrobacter*), cocos (por ejemplo, el género *Micrococcus*), hasta aquellas que presentan hifas fragmentadas (por ejemplo, en el género *Nocardia*) o micelio ramificado y altamente diferenciado como en el género *Streptomyces* (Ventura *et al.*, 2007). La mayoría de los actinobacterias desarrollan un micelio filamentososo que puede permanecer unido a la superficie del sustrato, al cual se le denomina micelio del sustrato, o bien desarrollarse en la parte externa en cuyo caso se denomina micelio aéreo. Los filamentos individuales o hifas del micelio se subdividen en unidades, producto de un crecimiento de la pared celular hacia el interior de la hifa en intervalos regulares a lo largo de esta estructura. A este proceso se le denomina septación y cada una de las septas resultantes contiene una molécula de ADN (Holt *et al.*, 2000).

1.2.1. Actinobacterias en el ambiente marino

Existen diversos reportes que indican que las actinobacterias se adaptan fisiológicamente a ambientes marinos, tal es el caso de *Micromonospora globosa*, la cual produce un antibiótico solamente si su crecimiento es en presencia de agua marina (Imada *et al.*, 2007).

Se reconocen tres géneros de la clase Actinobacteria predominantes del ambiente marino: *Micromonospora*, *Rhodococcus*, *Nocardia* y *Streptomyces* (Goodfellow y

Haynes, 1984). Sin embargo, las técnicas de biología molecular y la amplificación de regiones específicas de genes conservados han ido aumentando el conocimiento de la biodiversidad actinobacteriana presente en sedimentos marinos (Stach *et al.*, 2003; Magarvey *et al.*, 2004; Maldonado *et al.*, 2005b). De acuerdo con estudios de identificación y diversidad, las actinobacterias son bacterias dominantes en los sedimentos marinos (Gulve & Deshmukh, 2011). Karthik y colaboradores (2010), mencionan que hasta el momento se han reportado 83 especies de actinobacterias en hábitats marinos, las cuales pertenecen a 28 géneros distintos, siendo los *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Nocardia* y *Rhodococcus* los más comúnmente reportados, aunque con representantes no estrictamente marinos (Weyland, 1969, 1981; Goodfellow & Haynes, 1984; Pisano *et al.*, 1989; Colquhoun *et al.*, 1998; Kokare *et al.*, 2004)., Jensen y colaboradores (1991) reportaron que el número de aislados del género *Streptomyces* disminuía al aumentar la profundidad y distancia a partir de la costa a 450 metros de profundidad; mientras que el género *Micromonospora* aumentaba. En ese mismo estudio se mencionó que las especies recuperadas no tenían requerimientos especiales de agua marina. Fue en el 2002 que Mincer y colaboradores aislaron por primera vez actinobacterias con requerimientos específicos de agua marina pero la descripción taxonómica completa de ese grupo de microorganismos se llevó a cabo hasta el 2005 por Maldonado y colaboradores (Maldonado *et al.*, 2005a). El género resultante, *Salinispora*, sintetiza metabolitos orgánicos con actividades antibióticas y anticancerígenas siendo el compuesto más estudiado y conocido hasta el momento la “salinosporamida” (Feling *et al.*, 2003). Bredholt y colaboradores en el 2008 realizaron la búsqueda de actinobacterias de sedimentos marinos recolectados en los fiordos noruegos, donde evidenciaron que el género dominante en sedimentos profundos fue *Micromonospora*.

1.3. La Familia *Micromonosporaceae*

El orden *Actinomycetales* contiene al suborden *Micromonosporineae* al cual pertenece a la familia *Micromonosporaceae* (Stackebrandt *et al.*, 1997). El trabajo de Stackebrandt y colegas los menciona como una colección de géneros de diversidad morfológica y quimio taxonómica que por sí mismo constituyen entidades fenotípicas diferentes.

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

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

1.4. El Género *Micromonospora*

El género *Micromonospora* (Orskov 1923) es Gram positivo, quimiheterótrofo, aerobio y, con un alto contenido de G-C en su genoma (Hirsch *et. al.*, 2009). Quimiosistemáticamente el género se caracteriza por tener una pared celular tipo II debido a la presencia del ácido meso-diaminopimérico (*meso-A₂pm*) y/o 3-hidroxi-diaminopimérico, patrón celular de azúcar tipo D, fosfatidiletanolamina como fosfolípido característico (tipo PII) y patrón de ácido graso celular tipo 3b (Kawamoto, 1992). Existen 45 especies y 7 subespecies válidamente descritas para este género (www.dsmz.de), de las cuales 27 son halotolerantes.

Como parte del ciclo de vida de las especies del género *Micromonospora*, durante el desarrollo de la colonia la mayoría de las especies presentan una coloración naranja, la cual se va tornando negra durante la esporulación (Suarez & Hardisson, 1985). Parte del proceso está caracterizado por un micelio ramificado

bien desarrollado (0.2 – 0.6 µm de diámetro) con esporas esféricas que nacen como únicas sobre esporóforos cortos (0.5 – 1.5 µm de diámetro), (Kawamoto, 1992).

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

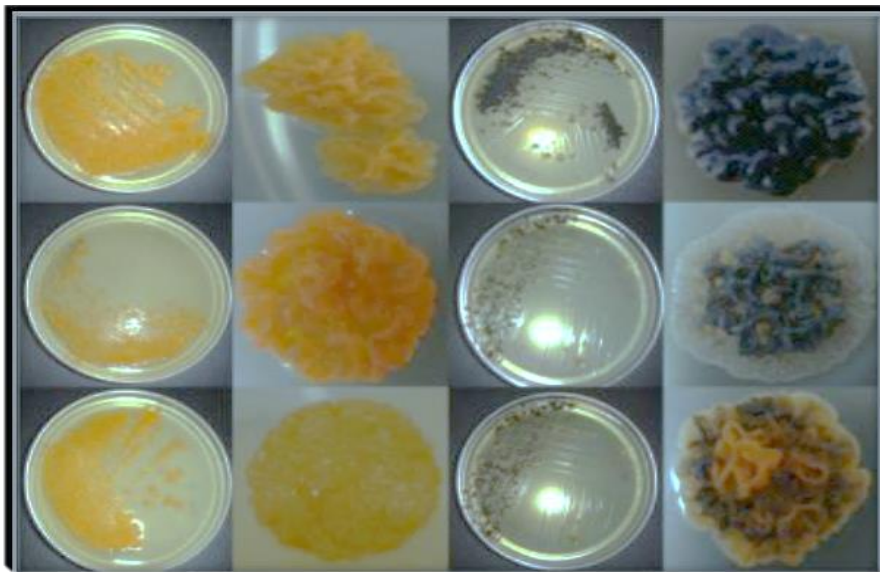


Figura 2. Miembros del género *Micromonospora* mostrando los diferentes estadios de los cultivos. Fuente: Maldonado & Quintana sin publicar

Existen 45 especies y 7 subespecies válidamente descritas para este género (www.dsmz.de), de las cuales se sabe que 27 de ellas son halotolerantes.

La estructura intragénica fue descrita por Koch y colaboradores en 1996, con un análisis de la secuencia del gen 16S rRNA de 15 especies válidamente descritas, 4 subespecies y 19 especies no descritas válidamente. En este trabajo, los autores sugirieron dividir el género en 2 subclados principales, cada uno de los cuales puede ser definido por un conjunto de firmas nucleotídicas dentro del gen 16S rRNA pero en donde pocas inferencias en cuanto a las relaciones internas podían confirmarse

mediante valores estadísticos (de bootstrap) mayores al 50% (Koch *et al.*, 1996). Así, la identificación del género *Micromonospora* queda apoyada, entre otras cosas, en pruebas fenotípicas como la utilización de diversas fuentes de carbono y nitrógeno y de estudios moleculares como la secuenciación del gen 16S.

1.4.1 Formación de micelio aéreo: Ciclo de vida de *Streptomyces*

Para explicar la formación de micelio aéreo se utilizará como modelo del ciclo de vida del género *Streptomyces* ya que el proceso no ha sido descrito en el género *Micromonospora*.

El género *Streptomyces* pertenece a la familia *Streptomycetaceae*. Engloba bacterias filamentosas, miceliales, Gram-positivas, aerobias, capaces de utilizar un gran número de compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía y con un elevado contenido en guaninas y citosinas (74% G+C) en su genoma (Woese, 1987). Su nombre se origina por su parecido con los hongos ya que son pleomórficos y producen un micelio normalmente diferenciado en micelio vegetativo y micelio aéreo, sin embargo, presentan características celulares típicas de procariotas tales como la carencia de núcleo, mitocondrias y cloroplastos (Stackebrandt *et al.*, 1992).

La importancia de estos organismos radica en su capacidad de producir una gran diversidad de metabolitos secundarios, la mayoría de ellos con actividad biológica. La producción de metabolitos secundarios, por lo general, coincide con el inicio de la diferenciación morfológica, una vez terminado el desarrollo vegetativo (Champness & Chater, 1994).

Dentro de estos metabolitos secundarios encontramos desde análogos de metabolitos primarios (aminoácidos, nucleótidos o polipéptidos) hasta antibióticos. Las bacterias del género *Streptomyces* son productoras de más de la mitad de los antibióticos conocidos (Bérdy, 1995). De los 12,000 antibióticos caracterizados en 1995: un 55% eran producidos por actinobacterias del género *Streptomyces*, un 11% por otras actinobacterias, un 12% por bacterias no filamentosas y el 22% restante por hongos filamentosos (Bérdy, 1995).

Los estreptomicetos presentan un ciclo de vida complejo que implica procesos de diferenciación morfológica y fisiológica. Estas actinobacterias son capaces de colonizar sustratos relativamente secos con restos de materia orgánica, formando una red de hifas tabicadas ramificadas que dan lugar al micelio sustrato (Chater, 1984). Estas hifas obtienen los nutrientes de la degradación del material orgánico insoluble gracias a numerosas enzimas hidrolíticas (Chater, 1984). En una primera etapa, las zonas más alejadas de la fuente de nutrientes empiezan a acumular sustancias de reserva (lípidos, glucógeno, etc.). En un determinado momento y, debido a la carencia de nutrientes, se reciben una serie de señales justamente en esta zona que disparan la expresión de genes implicados en la formación del micelio aéreo. Este micelio rompe la tensión superficial al escapar del ambiente acuoso del micelio vegetativo (Chapness & Chater, 1994). Estas hifas se van a nutrir de los productos de degradación del micelio sustrato, y en una segunda etapa van a sufrir un proceso de curvatura, enrollamiento, formación de septos y engrosamiento de la pared celular para dar lugar a una cadena de esporas uninucleares, que se liberarán al medio y que, con las condiciones adecuadas, germinarán y desarrollarán un nuevo micelio sustrato (Figura 3) (Chapness & Chater, 1994). La producción de metabolitos secundarios, por lo general, coincide con el inicio de la diferenciación morfológica, una vez terminado el desarrollo vegetativo (Chapness & Chater, 1994)

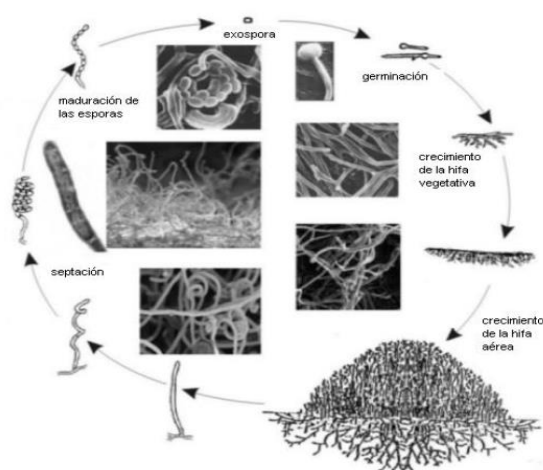


Fig. 3: Representación del ciclo de vida de *Streptomyces*

Para romper la tensión superficial del medio y crecer en el aire, *Streptomyces coelicolor* tiene que cubrir su hifa aérea de una capa hidrofóbica, la cual no se encuentra en la hifa vegetativa en el medio acuoso, y también de péptido surfactante SapB (Flärdh y Buttner, 2009). La reciente elucidación de la estructura de SapB, la identificación de los genes que especifican su producción, así como la caracterización de los componentes principales de la capa hidrofóbica son importantes avances en el entendimiento de la morfogénesis del metabolismo secundario de los estreptomicetos (Flärdh y Buttner, 2009).

Se sabe que SapB se encuentra codificado por un cluster de genes de formación rápida de micelio aéreo (*ram*), el cual contiene *ramR*, un gen que codifica para un regulador que activa el operón *ramCSAB*: *ramS* codifica para un prepéptido de SapB de 42 aminoácidos, el cual sufre una extensa modificación pos-traducciona catalizada por la SapB-sintetasa *RamC*. Se cree que el dominio amino terminal de *RamC* funciona como una deshidratasa de serina que convierte 4 residuos de serina de *RamS* en dehidroalaninas (Dha), de las cuales 2 reaccionan subsecuentemente con tioles de cisteína para formar anillos intramoleculares de lantioninas. Esta reacción es catalizada por el dominio C-terminal de ciclasa de *RamC*. Por último, el péptido líder es removido por una proteasa desconocida para generar el residuo maduro de 21 aminoácidos de SapB, el cuál probablemente sea exportado de la hifa por el transportador ABC (del inglés, *ATP-binding, cassette transporter*) codificado por *ramA* y *ramB* (Kodain *et al.*, 2004) (Fig. 4)

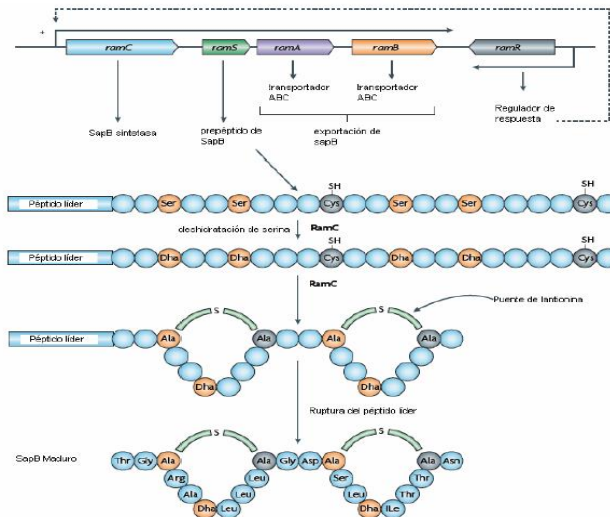


Fig. 4: Modelo de la biosíntesis del péptido surfactante sapB (Modificado de Flårdh y Buttner, 2009)

Se sabe que copias extra del cluster *ram* inducen una formación del micelio aéreo muy rápida, mientras que la delección de éste en *S. griseus*, causa la pérdida del micelio aéreo (O'Connor *et al.*, 2002).

El regulador de respuesta RamR activa los genes para la producción y exportación de SapB, pero RamR no posee ningún gen sensor genéticamente ligado y no se sabe nada de mecanismos reguladores, lo cual sucede al nivel de la formación del micelio aéreo (Kodain *et al.*, 2004). En la figura 5 se puede explicar el proceso de cascada de la formación del micelio aéreo (Flårdh y Buttner, 2009).

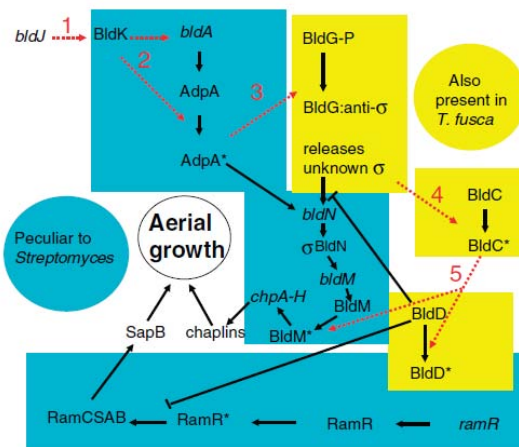
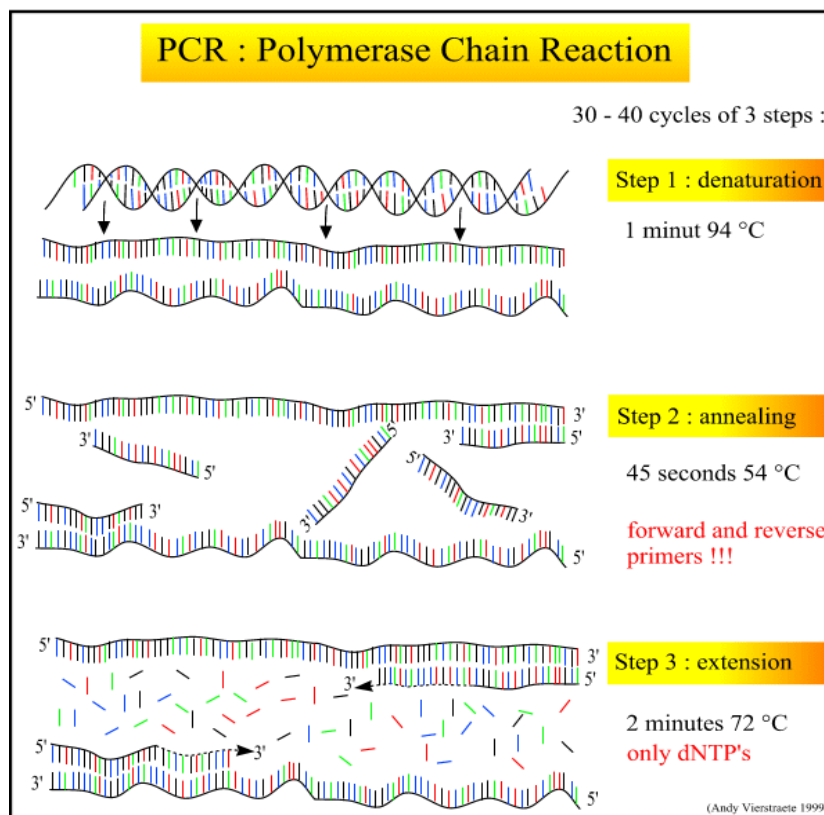


Figura 5: Distribución de los genes implicados en la cascada extracelular para la formación del micelio aéreo (modificado de Chater & Chandra, 2006)

1.5 Reacción de cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR fue diseñada por Kary Mullis en 1983 aunque su primera publicación fue hasta el año de 1985. La técnica tiene su base en la actividad de la enzima ADN polimerasa, que cuenta con la capacidad de sintetizar una nueva cadena de ADN complementaria a partir de otra ya existente. Los requisitos de la enzima para llevar a cabo esta reacción son que existan nucleótidos en el medio (la materia base para fabricar la cadena complementaria de ADN) y una cadena corta de ADN (oligonucleótido) que pueda unirse a la molécula que se requiera copiar para que sirva como cebadora o “primer” (Madigan, *et al.*, 2009). La técnica emplea mínimas cantidades de ADN y consta básicamente de 3 pasos fundamentalmente divididos en varios ciclos que comprende:

- a) Desnaturalización (95°C)
- b) Alineamiento (55°-60°C)
- c) Extensión (72°C)



Figur 6: Representación esquemática de un PCR

En una PCR el primer paso, que consiste en la desnaturalización de la doble hélice del ADN, requiere del aumento de calor para lograr que los extremos 3' sean separados y se puedan aparear con oligodesoxinucleótidos complementarios, con la respectiva formación de híbridos estables con la molécula que funciona como molde o "plantilla" (alineamiento). Los oligonucleótidos funcionan como cebadores (oligos o "primers"). Para la extensión se utiliza una polimerasa resistente a la desnaturalización por calor; en general se utiliza la *Taq*-polimerasa (aislada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*), la cual actúa extendiendo los extremos 3' de los oligos empleando las hebras del ADN bicatenario como plantilla (Figura 6) (Madigan, *et al.* 2009).

1.6 Gen 16S rRNA

Ciertas macromoléculas se consideran relojes evolutivos (medidas del cambio evolutivo) debido a que nos permiten establecer las relaciones evolutivas entre diferentes microorganismos. Estas moléculas se eligen como marcadores no sólo porque están universalmente distribuidas, sino que deben además ser funcionalmente homólogas en cada organismo (Madigan *et al.*, 2006) Los RNAs ribosomales son los relojes moleculares (o evolutivos) más ampliamente utilizados para establecer estas relaciones (Madigan *et al.*, 2006).

El operón del RNA ribosomal se encuentra conformado de la siguiente manera (5' → 3'): rRNA 16S, región espaciadora intergénica 1 (ITS1), rRNA 13S, región espaciadora intergénica 2 (ITS2), y rRNA 5S tal como se indica en la figura 7, (Maldonado, 2002).

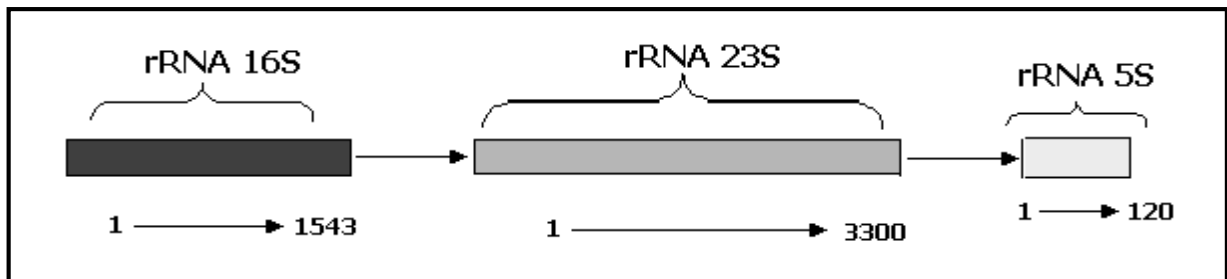


Figura 7. Operón del rRNA. Cada rectángulo indica los genes del operón. Las designaciones 16S, 23S y 5S corresponden a los tamaños de las subunidades en unidades Svedberg de sedimentación. Las flechas indican la transcripción del operón, que va de izquierda a derecha. Los números flanqueando las flechas indican el tamaño aproximado de cada subunidad en bases en bases.

Fuente: Modificado de Maldonado, 2002.

Para el estudio de bacterias y arqueas se recurre a la secuencia de la subunidad 16S rRNA porque reúne ciertas características favorables como: a) ser componentes cruciales de los ribosomas, b) poseer una función común en todas las células y c) su estructura primaria en un mosaico de secuencias conservadas y variables que permiten el alineamiento de posiciones homólogas y la identificación de secuencias conservadas (Head, 2004). Existe poca evidencia de transferencia horizontal de genes de rRNA. Del mismo modo podemos contar con bases de datos muy completas de secuencias de rRNA para la comparación o identificación de secuencias. El gen 16S presenta un tamaño adecuado, con 1,543 bases o nucleótidos y proporciona una buena resolución en el análisis filogenético sobre todo a nivel género, y en algunos casos hasta a nivel de especie (Head, 2004).

En la actualidad numerosas identificaciones moleculares a nivel de género para la clase *Actinobacteria* están basadas en el empleo de oligos dirigidos al gen 16S (Moron *et al.*, 1999; Salazar *et al.*, 2000, 2002; Tan *et al.*, 2006); inclusive existen oligos considerados como *universales* que pueden amplificar cualquier clase u orden de bacteria, por ejemplo, el par de oligos F27 y R1492(Stach *et al.*, 2003b). Contrariamente existen otros conocidos como específicos, como los oligos S-C-Act-235-a-S-20 y S-C-Act-878-a-A-19, que muestran una especificidad del 82% hacia los géneros de la clase *Actinobacteria* (Stach *et al.*, 2003b). Bajando en el sistema jerárquico taxonómico, los oligos específicos para la familia *Micromonosporaceae* son el M2F y A3R (Monciardini *et al.*, 2002) mientras que el par M558F y C1028R son género específico para *Micromonospora* (Qiu *et al.*, 2008).

2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Este proyecto cobra importancia en la investigación de la clase Actinobacteria debido a la falta de información acerca de la formación de micelio aéreo en el género *Micromonospora*. A pesar de que la formación de micelio aéreo (MA) no se considera como una característica taxonómica importante, su estudio es sumamente importante cuando se utiliza como un indicador de especies productoras de metabolitos secundarios con actividad biológica. Como ejemplo, la especie válidamente descrita: *Micromonospora echinospora* (terrestre), presenta esta característica y es responsable de producir la gentamicina. Esta correlación se ha observado en otras especies de *Micromonospora*, por lo tanto, es importante conocer los procesos fenotípicos y genotípicos de esta formación

3. OBJETIVOS

General

- Estudiar la formación de micelio aéreo (MA) en *Micromonospora* de origen acuático de ambientes nacionales como el Golfo de California.

Específicos

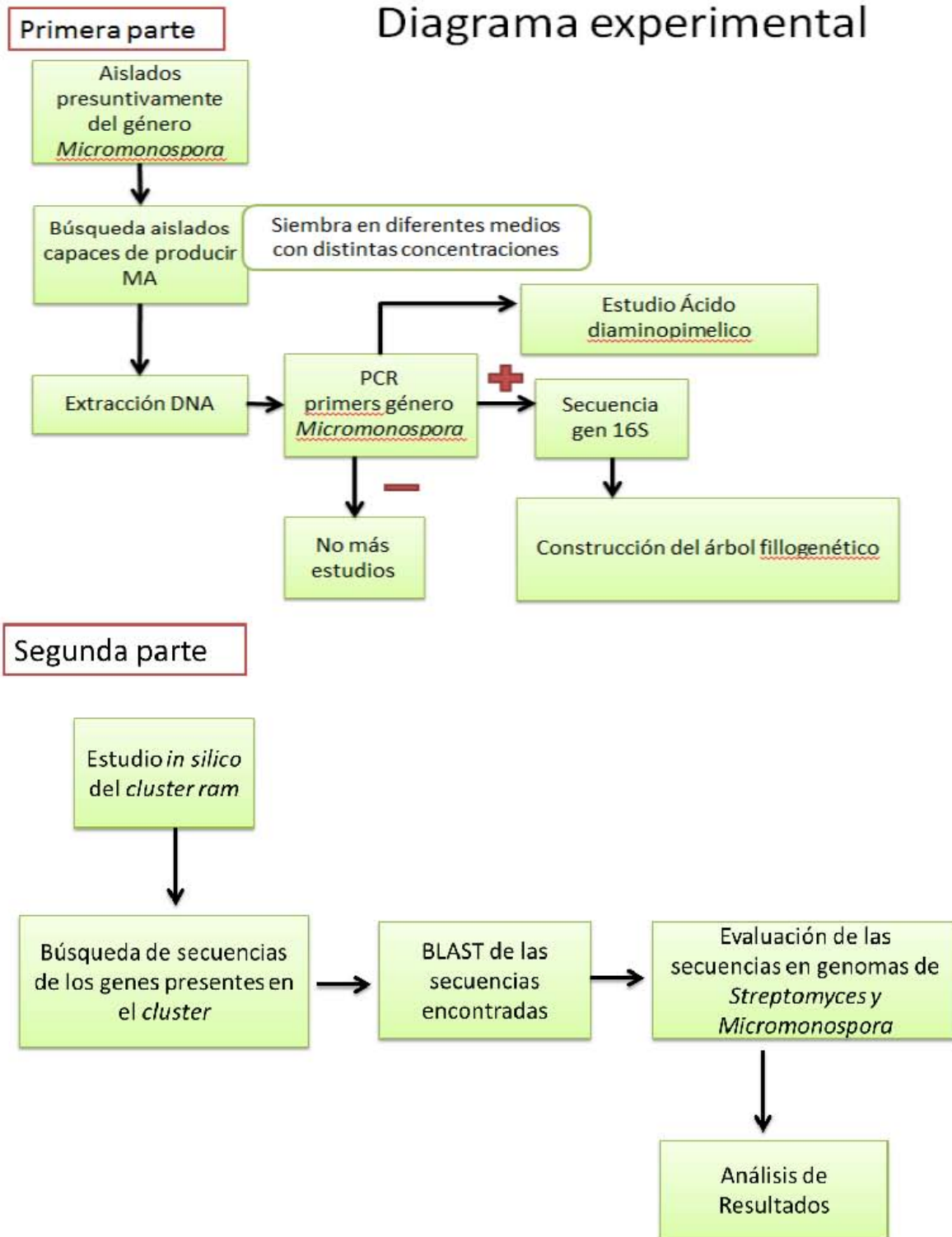
- Dentro de los aislados marinos del género *Micromonospora* observar qué porcentaje produce MA y en qué condiciones de laboratorio se presenta.
- Encontrar las condiciones óptimas para que se dé la formación de Micelio aéreo dentro del género *Micromonospora*.
- Establecer la presencia/ausencia de genes previamente reportados para la formación MA en *Streptomyces* en genomas disponibles de *Micromonospora*.

4. HIPOTESIS

El proceso de formación de micelio aéreo en cepas de *Micromonospora* aisladas de sedimentos marinos del Golfo de California es fenotípica y genotípicamente similar al reportado en cepas de *Streptomyces* con genomas secuenciados.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

La estrategia experimental se presenta en el siguiente diagrama, dividido en 2 partes:



5.1. Aislados microbianos.

Se manejaron 3 series de aislados que, por sus características macroscópicas, fueron considerados como miembros del género *Micromonospora*. Las series son identificadas con las claves RD, GC y LT; en la tabla 1 se describen los códigos de cada serie y el origen de cada uno de los aislados.

Tabla 1: Origen de los aislados.

Serie RD Golfo de California			Serie GC Golfo de California			Serie LT Laguna de Términos, Campeche	
001	021	043	BA-1	BL-10	DX-9	LT-50	LT-64
002	022	044	BA-2	BL-12	DX-12	LT-51	LT-65
004	023	047	BA-9	CV-4	DA-4	LT-52	
006	024	048	BA-13	CV-5	14	LT-53	
007	025	049	BA-15	CV-7	64	LT-54	
008	026	050	BA-18	CV-11		LT-55	
011	027	052	BD-1	CV-1		LT-56	
014	029	053	BD-3	CV-20		LT-57	
015	030	054	BL-1	DU-2		LT-58	
016	031	055	BL-3	DU-4		LT-59	
017	033	056	BL4	DU-6		LT-60	
018	036	057	BL-6	DU-10		LT-61	
019	039		BL-8	DU-11		LT-62	
020	041		BL-9	DU-12		LT-63	

5.2. Búsqueda de aislados capaces de producir MA

Los aislados se sembraron en diferentes medios de cultivo: GYM (Agar glucosa extracto de levadura y malta, Catálogo DSMZ, 2001), YEME (Agar extracto de levadura y malta, Shirling & Gottlieb, 1966), GYEA (Agar Glucosa extracto de Levadura; Gordon & Mihm, 1962) y AO (agar avena), (Apéndice A) con 3 concentraciones diferentes de cloruro de sodio (NaCl) y SM (sales marinas, Red Sea) a 0, 1 y 2%.

En cada caja se inocularon 4 aislados, tomando 7µL de la suspensión de esporas con una micropipeta Gilson (Gilson, Francia), y vertiendo en el plato a modo de gota (figura 8).

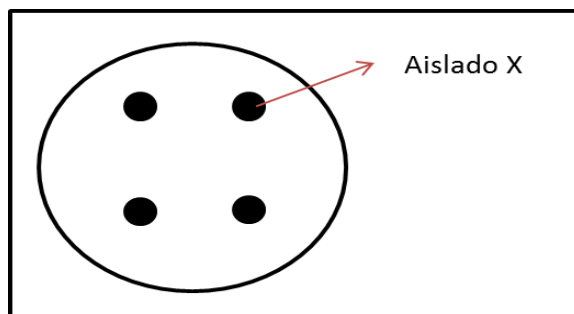


Figura 8: Diseño experimental de la inoculación de los aislados en las cajas.

Posteriormente los platos se incubaron a 30 °C y se observó el crecimiento de los aislados a los 14, 21 y 28 días de incubación, buscando como característica principal la presencia de micelio aéreo con ayuda de un estereoscopio. Este procedimiento se realizó con cada uno de los medios y en caso de tener un aislado MA positivo, éste fue documentado por fotografía.

5.3 Extracción de ADN y electroforesis.

Para la extracción de ADN los aislados se crecieron en medio GYM durante 14 días; a continuación, se realizó una extracción fenólica 1:1. Para ello se etiquetaron tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL con la clave de cada cepa. Se agregaron 100 µg de perlas de vidrio y 500 µL de Buffer Glucosa-Tris-EDTA (GTE; ver Apéndice B). Se transfirieron dos asas de biomasa fresca dentro de cada tubo. Los tubos se mantuvieron a 4 °C durante 12 horas. Pasando este tiempo se agitaron constantemente durante 15 minutos en Vórtex (DAIGGER, GENIE 3, USA). Posteriormente los tubos se centrifugaron por 15 minutos a 14,100 Xg en una centrifuga MiniSpin Plus (Eppendorf, USA). El líquido se transfirió (300-400 µL aproximadamente) a un nuevo tubo Eppendorf limpio, seco y estéril y la biomasa y perlas de vidrio remanentes en el tubo original se eliminaron. Se adicionó el mismo volumen de Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamilico (25:24:1; v/v) al líquido transferido, este tubo se mezcló en el Vórtex a velocidad máxima por 5 segundos previo a una centrifugación a 14, 100 Xg durante 12 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf limpio, seco y estéril (1.5mL), se adicionó etanol frío (100%)

en una relación 2:1 (v/v) y cada tubo se invirtió tres veces suavemente. Los tubos se mantuvieron en refrigeración por 2 horas. Pasado este tiempo se centrifugaron 15 minutos a 14,100 Xg. Se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla de ADN con 200 μ L de etanol al 70% (esto se repitió dos veces). Los tubos se centrifugaron a 14,500 rpm durante 15 minutos y posteriormente el líquido remanente se decantó. Los tubos se secaron a temperatura ambiente invirtiéndolos sobre papel absorbente durante 12 horas. El ADN se reconstituyó con 100 μ L de buffer TE 1X (Tris- EDTA, ver Apéndice B).

La calidad del ADN se confirmó por electroforesis horizontal. Se preparó un gel de agarosa al 1% en buffer TAE 0.5X (Apéndice B), se pesó 1 g de agarosa en una balanza analítica el cual se agregó a 100 mL de Buffer TAE 0.5X y se calentó hasta disolver en un horno de microondas. Se agregaron 0.4 μ L de Bromuro de Etidio, dejando enfriar durante 15 minutos y pasado este tiempo se vertió en una charola de plástico de electroforesis con peine. La agarosa se dejó enfriar a temperatura ambiente en una campana de extracción hasta su completa gelificación, posteriormente se retiraron los peines y se colocó en una cámara de electroforesis (Sigma-Aldrich) saturada con buffer TAE 0.5X.

Para la carga de la muestra, se mezclaron 5 μ L ADN (o producto de PCR) con 2 μ L de buffer de corrida en cada pozo. Adicional a las muestras se colocó 1 μ L de marcador molecular 1kb (BioLine, EUA) al principio y al final del gel. La cámara de electroforesis se conectó a una fuente de poder y se programó a 75 V. El tiempo de corrida fueron 45 minutos. El ADN genómico se visualizó usando un transiluminador y fotodocumentador (EagleEye, USA).

5.4 PCR género *Micromonospora* y gen 16S

Se llevaron a cabo dos amplificaciones mediante PCR con iniciadores específicos para el gen 16S rRNA. Uno de ellos para determinar la pertenencia de los aislados al género *Micromonospora* utilizando los primers M558F [5'-CGGCTTGTCGCGTCTGACT-3'] y C1028R [5'-ATGCACCACCTGTGACCGC-3']

(Qui *et al.*, 2008), el segundo para la amplificación completa del gen 16S rRNA que se llevó a cabo utilizando los iniciadores 27f [5'-AGAGTTTGATCMTTGGCTCAG-3'] y 1525r [5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3'] (Lane, 1991).

Las mezclas de reacción se describen en la tabla 2. Las condiciones del programa de PCR se ajustaron a una predesnaturalización a 95 °C por 2 minutos durante un ciclo; 35 ciclos donde se presenta una desnaturalización a 95°C por 45 segundos, un alineamiento a 55 °C por 45 segundos y una extensión a 72 °C por 30 segundos.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador MULTI GENE II Labnet, International Inc.

Tabla 2: Mezcla de reacción del PCR para el gen 16S rRNA

Reactivo	Específico <i>Micromonospora</i>	16S rRNA completo
Buffer NH₄ (10X)	2 µL	2.5 µL
MgCl₂ (50mM)	0.6 µL	0.7 µL
dNTP_s (10mM)	0.5 µL	0.625 µL
Primer 1 (20mM)	0.2 µL	1 µL
Primer 2 (20mM)	0.2 µL	1 µL
ADN	0.3 µL	0.5 µL
Taq polimerasa	0.08 µL	0.1 µL
H₂O	cbp 25 µL	cbp 19.075µL

NOTA: la mezcla de reacción puede variar durante el experimento.

Los productos obtenidos se observaron en una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%. Una vez obtenido el producto de PCR del gen 16S se purificará con QIAquick PCR Purification Kit Protocol de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los productos ya purificados se enviaron a secuenciar al Instituto de Biología, UNAM.

5.5. Análisis Filogenético.

Las secuencias del gen 16S se analizaron y ensamblaron en el programa Chromas, se alinearon con secuencias válidamente descritas, *M. echinospora* (DSM43816), *M. aurantiaca* (ATCC27029), *M. chalcea* (ATCC12452), *M. carbonacea* (ATCC27114) y *M. tulbaghiae* (DSM45142), por medio del programa Clustal X.

Ya con las secuencias editadas se llevó a cabo la construcción del árbol filogenético en el portal web phylogeny.fr, usando las siguientes opciones: programa de alineamiento MUSCLE, edición en Gblocks, inferencia filogenética mediante el método "Neighbor Joining"; finalmente el árbol se adecuó con TreeDyn. Se usaron los parámetros por *default* para todos los programas.

Así mismo, todas las secuencias fueron comparadas contra bases de datos públicas (NCBI), mediante el algoritmo de Blastn para determinar su porcentaje de identidad a especies ya descritas.

5.6 Determinación de isómeros del ácido diaminopimélico.

La extracción del ácido diaminopimélico (DAP), se llevó a cabo siguiendo el protocolo modificado de Staneck y Roberts (1974).

En crioviales estériles se agregaron 500 μ L de HCl 6M, perlas de vidrio (100 μ g) y 3 asadas de biomasa de los aislados; los tubos se agitaron a velocidad máxima por 5 segundos en un vortex.

Los tubos fueron calentados a 100 °C durante 4 horas en un horno de convección. Pasado el tiempo se dejaron enfriar aproximadamente 10 min y después se centrifugaron a 6000 rpm por 5 minutos, el líquido se transfirió a tubos eppendorf de 1.5 mL limpios y estériles, se colocaron en un baño seco a 100 °C hasta sequedad. Ya secos se realizó el primer lavado adicionándoles 500 μ L de agua estéril y se volvieron a colocar en el baño seco a 100 °C hasta sequedad; el proceso se repitió dos veces. Después de los lavados se reconstituyó el DAP extraído con 100 μ L de agua estéril.

El DAP extraído se observó mediante cromatografía de capa fina de alta resolución (TLC). Se cargaron 3 μ L de cada muestra. La placa corrió por aproximadamente 4 horas en una solución de MeOH:agua:HCl6M:piridina (80:26:4:10; v/v); se dejó secar 15 min y posteriormente se asperjó con ninhidrina. Se colocó en una parrilla de cromatografía de alta resolución (CAMAC, Suiza) programada a 100°C por 15 minutos.

5.7 Estudio *in silico*.

Este estudio se realizó con el objetivo de comprobar si alguno de los genes del *clúster ram* utilizados por *Streptomyces* durante la formación de micelio aéreo (Kodain *et. al.*, 2004) se encuentran presentes en los genomas de dos *Micromonosporas* cuyo genoma ha sido completamente secuenciado y que están relacionadas filogenéticamente con las *Micromonosporas* estudiadas en la primera parte de este trabajo (Figura 9). Para ello, se llevó a cabo una revisión bibliográfica en la base de datos de PudMed para seleccionar trabajos que estudiaran el proceso de formación de micelio aéreo en cepas de *Streptomyces* y reportaran el cluster *ram* y sus genes. Se eligieron las secuencias proteicas codificadas por los genes reportados por Keijser y colaboradores (2002) y Hongtao & Kendall (1994) con números de acceso AL939128.1 (fragmento de cromosoma de aproximadamente 300,000 pb), AF139177.1 (4 genes de aproximadamente 600 pb cada uno), U03771.1 (3 genes de aproximadamente 600 pb cada uno) para realizar el análisis.

El primer análisis *in silico* que se realizó consistió en utilizar el programa pfectBLAST (Santiago-Sotelo & Ramírez prado, 2012) para comparar los 3 genes seleccionados (ramA, AAD33775.1 y AAA21388.1; ramB, AAD33776.1 y AAA21389.1; y ramR, AAD33777.1 y AAA21390.1) mediante BLAST-P (secuencias de proteínas en forma de aminoácidos) con el genoma de *Streptomyces coelicolor* y de esta forma seleccionar los 3 mejores *matches* (alto porcentaje de identidad) para buscarlas dentro de los genomas de *Micromonospora*.

El análisis *in silico* final consistió en utilizar tanto el programa prfectBLAST (Santiago-Sotelo & Ramírez-Prado, 2012), como las herramientas disponibles en la plataforma abierta <http://img.jgi.doe.gov/edu/> para realizar una comparación mediante BLAST-P (secuencias de proteínas en forma de aminoácidos) entre las tres proteínas seleccionadas y los genomas de *M. echinospora* (DSM 1040) y *M. aurantiaca* (ATCC 27029)

6. RESULTADOS

6.1. Aislados capaces de producir MA

En la tabla 3 se observan los resultados obtenidos en la búsqueda de aislados capaces de producir MA, utilizando los diferentes medios de cultivo a diferentes concentraciones de NaCl y SM (sales marinas).

SERIE	# aislados	MA	Medio	%
GC	35	BL-1 BL-9 BL-4 CV-4 14 64	GYM (1% NaCl; 1, 2% SM) YEME (1% NaCl; 1, 2% SM) GYM (1, 2% NaCl; 1, 2% SM) YEME (1, 2% SM) GYM (1% NaCl) OA (1% SM) GYM (0, 1, 2% NaCl) GYM (0, 1, 2% NaCl)	~17
RD	40	RD-008	GYM (2% SM)	~2.5
LT	13	LT-59	GYM (2% NaCl)	~8

Tabla 3: Resultados de las pruebas en diferentes medios.

La tabla 3 muestra que la localidad de donde se obtuvo el mayor número de aislados que pertenecen al género *Micromonospora* fue el Golfo de California con la serie RD (Golfo de California, recolección 2010) con 40 aislados, seguido por la

serie GC (Golfo de California, recolección 2006) con 35, mientras que la serie LT (Laguna de Términos) solamente mostró 13. El mayor número de aislados capaces de producir MA provino de la serie GC con un 17% al ser cultivados en los medios GYM (1 y 2% de NaCl y SM,) y YEME (1% NaCl y 1 y 2% de SM). Solamente un aislado de la serie GC presentó MA al cultivarlo en medio OA (agar avena, al 1% de SM). Las series RD y LT presentaron solamente un aislado con formación de MA al cultivarlos respectivamente en medios GYM 2% de SM y 2% de NaCl.

La observación de MA se realizó a través de un microscopio estereoscópico. Como ejemplo representativo, en la figura 9 se muestra uno de los aislados que presentaron la formación de MA.



Figura 9: Aislado BL-1, formación de MA (indicado con el círculo rojo).

La mayoría de los aislados presentaron una morfología muy similar, sin embargo, cada aislado presentó una característica propia como la formación de micelio aéreo, la cual se observa como un “polvo” blanco sobre la colonia.

La búsqueda de aislados capaces de producir micelio aéreo fue exitosa y arrojó resultados interesantes para proponer una condición adecuada para intentar inducir esta característica a cualquier aislado perteneciente al género *Micromonospora*, así como para continuar un estudio a nivel genético y tratar de describir este proceso.

6.2. Extracción ADN, PCR para género y 16S rRNA

Se extrajo ADN de los 8 aislados que presentaron formación de MA. En la figura 10 se presenta el gel de agarosa de las muestras del ADN extraído, en donde se observan en 7 de ellas bandas brillantes y compactas, lo cual es un indicio de la presencia de ADN puro y sin degradar.

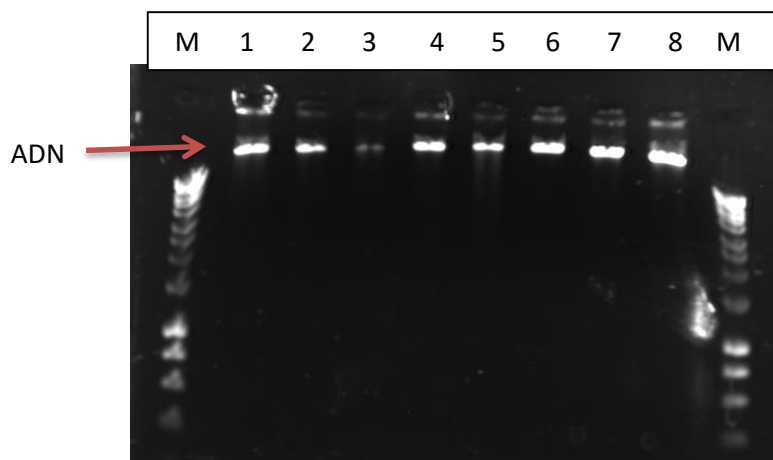


Figura 10: los carriles numerados del 1 al 8 corresponden a los aislados que presentaron formación de MA identificados en la tabla con el código WM; los carriles identificados con la letra M corresponden al marcador molecular de 1kb (Bioline, USA)

Los genes 16S (fragmento y completo) se amplificaron con primers específicos. En la figura 11 podemos observar el producto de amplificación mediante PCR del fragmento del gen 16S diagnóstico del género *Micromonospora* y en la figura 12 la amplificación del gen completo 16S rRNA. Para el primero podemos observar una banda brillante de aproximadamente 470 pb, lo que indica la pertenencia a este género de 7 de los 8 aislados (el aislado del carril número 8 que no presentó banda ya no se utilizó para las siguientes pruebas); en el segundo gel correspondiente al gen 16S completo, solo se observan 3 bandas brillantes en la posición aproximada de 1500 pb lo que indica positivo para este gen.

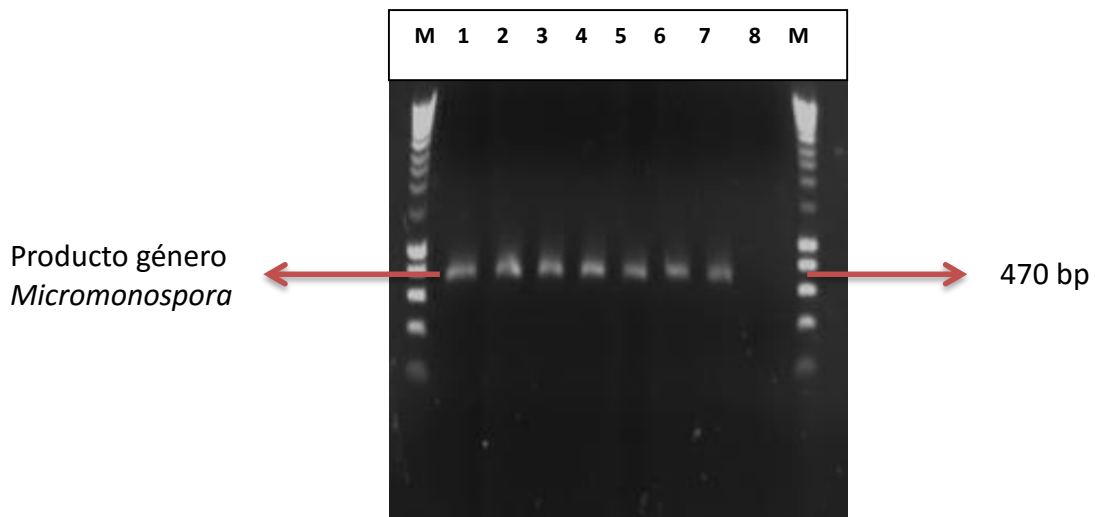


Figura 11: Gel del producto de PCR con los primers específicos para el género *Micromonospora*; los carriles del 1 al 8 corresponden a los aislados que presentaron; los carriles identificados con la letra M corresponden al marcador molecular de 1kb (Bioline, USA)

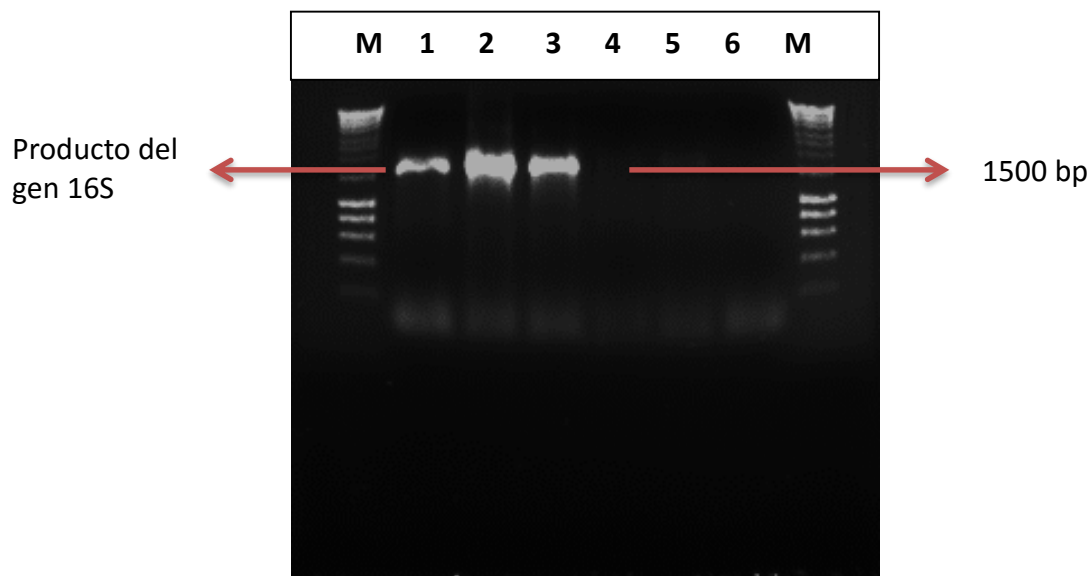


Figura 12: Gel del producto de PCR del gen 16S; los carriles 1 a 3 corresponden a los aislados BL-1, BL-9 y CV-4; el carril 6 corresponde al control negativo y los carriles identificados con la letra M corresponde al marcador molecular de 1kb (Bioline, USA)

Se purificaron los tres aislados positivos para el género *Micromonospora* y para el gen 16S rRNA (BL-1, BL-9 y CV-4), y después se utilizaron para realizar la identificación filogenética.

6.3. Identificación por aproximación filogenética.

La posición taxonómica de los 3 aislados del género *Micromonospora* se estableció mediante aproximación filogenética. En la figura 13 se muestra el árbol filogenético construido a partir de las especies válidamente descritas y obtenida de la base de datos. Podemos observar que los aislados BL-1 y BL-9 (aislados del género *Micromonospora* capaces de producir MA, obtenidos de sedimentos del Golfo de California) se encuentran relacionados filogenéticamente con *M. tulbaghia*, y el aislado CV-4 forma un clado con *M. coerula* y *M. coriariae*.

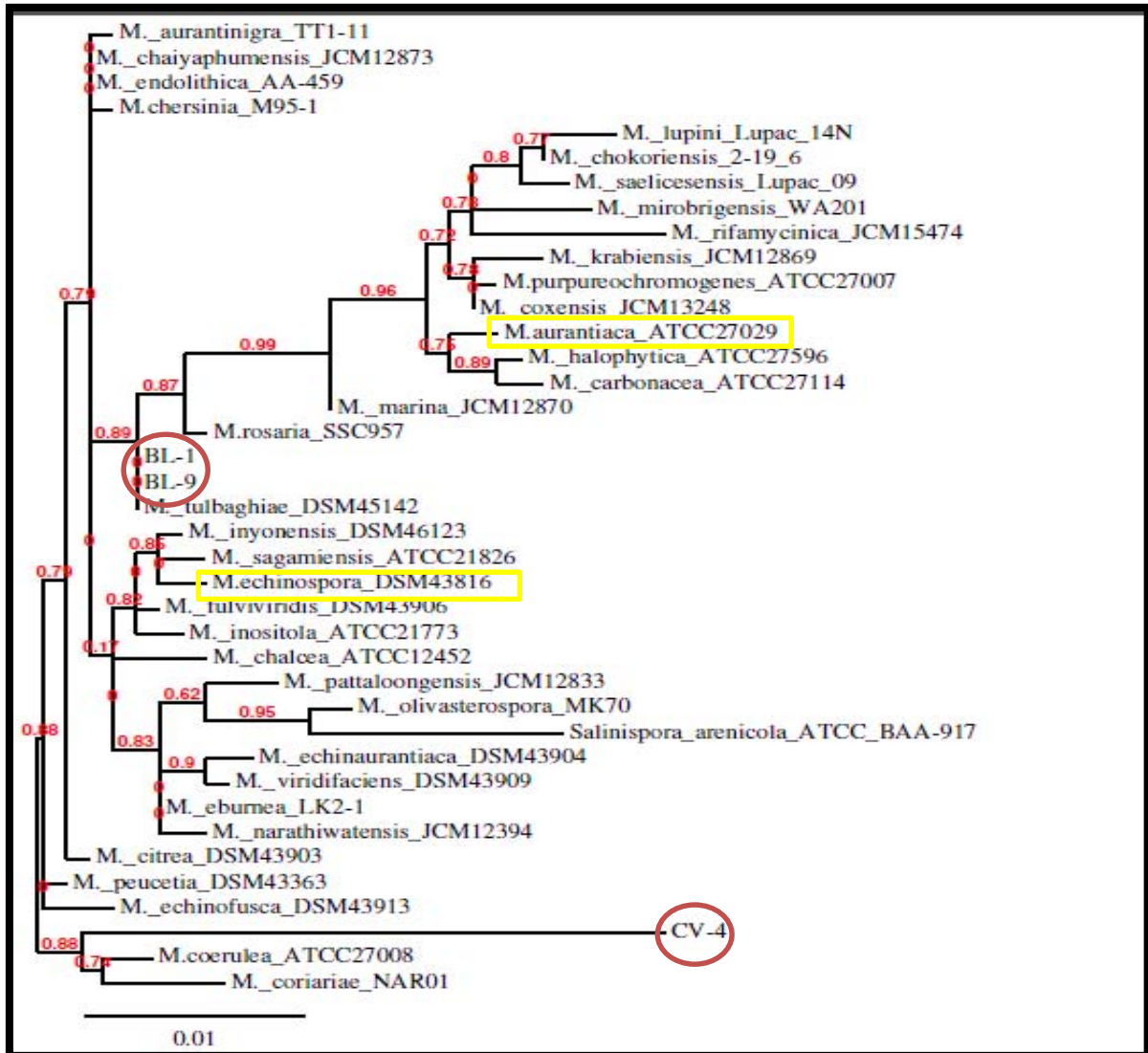


Figura 13: Árbol filogenético de secuencias del gen 16S de aislados del género *Micromonospora*.

6.4 Determinación del isómero del ácido diaminopimérico (DAP)

De los 9 aislados estudiados 8 presentan el isómero de forma meso-A2pm, y solo uno (el aislado LT-59) presenta el isómero en forma 3-hidroxi; en la figura 14 se puede observar de mejor manera la posición de los isómeros. Esta es solo una de las pruebas que existen para la confirmación de actinobacterias del género *Micromonospora*.

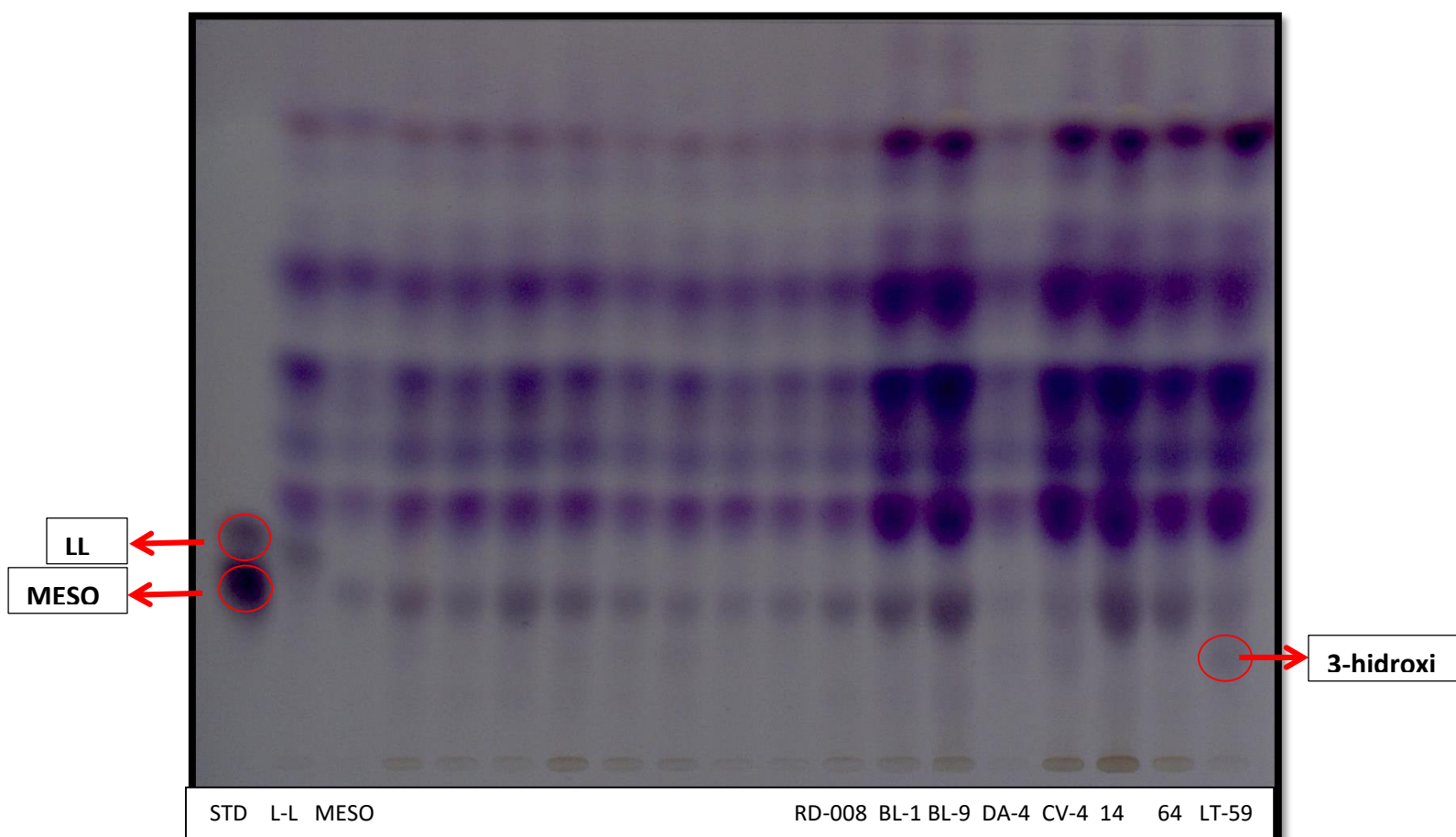


Figura 14: cromatografía en capa fina de alta resolución (TLC) de los isómeros del DAP

Nota: STD: estándar comercial de los isómeros del A2pm (Sigma-Aldrich, México); L-L: isómero LL-A2pm como control *Streptomyces sp.*; MESO: isómero meso-A2pm como control *Nocardia farcinica*; los carriles no marcados corresponden a otros aislados presuntamente del género *Micromonospora*.

6.5 Estudios *in silico*.

Después de realizar una comparación entre las secuencias del *cluster ram* con número de acceso AAA21390.1, AAA21389 y AAA21388.1 y los genomas de *Micromonospora aurantiaca* (ATCC 27019) y *M. echinospora* (DSM 1040), los resultados que se obtuvieron se visualizan en las siguientes tablas:

Micromonospora aurantiaca

a) AAA21388.1

# Acceso	Proteína	valor E	% Ident
2501792517	ABC-type multidrug transport system, ATPase and permease components	1e-040	36
2501793158	ABC transporter, CydDC cysteine exporter (CydDC-E) family, permease/ATP-binding protein CydD	3e-025	39
2501788941	ABC-type cobalamin/Fe ³⁺ -siderophores transport systems, ATPase components	6e-015	32
2501792792	ABC-type antimicrobial peptide transport system, ATPase component	1e-014	33
2501787423	amino acid ABC transporter ATP-binding protein, PAAT family	5e-012	34
2501792636	oligopeptide/dipeptide ABC transporter, ATP-binding protein, C-terminal domain	6e-012	30
2501788770	ATPase components of ABC transporters with duplicated ATPase domains	8e-011	32
2501788709	cell division ATP-binding protein FtsE	5e-010	26
2501786934	cobalt transport protein ATP-binding subunit	6e-010	33
2501791724	phosphate ABC transporter ATP-binding protein, PhoT family	1e-006	27
2501787917	monosaccharide ABC transporter ATP-binding protein, CUT2 family	2e-006	27

b) AAA21389.1

# Acceso	Proteína	valor E	% Ident
2501788766	ABC-type multidrug transport system, ATPase and permease components	4e-032	34
2501793157	ABC transporter, CydDC cysteine exporter (CydDC-E) family, permease/ATP-binding protein CydC	2e-021	38
2501788709	cell division ATP-binding protein FtsE	8e-017	31
2501789198	ABC-type antimicrobial peptide transport system, ATPase component	1e-016	38
2501788400	ABC-type sugar transport systems, ATPase components	2e-016	31
2501787423	amino acid ABC transporter ATP-binding protein, PAAT family	2e-015	37
2501787917	monosaccharide ABC transporter ATP-binding protein, CUT2 family	3e-015	34
2501789479	carbohydrate ABC transporter ATP-binding protein, CUT1 family	1e-014	34
2501786934	cobalt transport protein ATP-binding subunit	2e-014	30
2501791712	oligopeptide/dipeptide ABC transporter, ATP-binding protein, C-terminal domain	9e-012	30
2501792349	daunorubicin resistance ABC transporter ATP-binding subunit	6e-009	30

c) AAA21390.1

# Acceso	Proteína	valor E	% Ident
2501787249	Response regulator containing a CheY-like receiver domain and an HTH DNA-binding domain	3e-027	39
2501789931	two component transcriptional regulator, LuxR family	1e-011	29

Micromonopora echinospora

d) AAA21388.1

# Acceso	Proteína	valor E	% Ident
2585692242	ABC-type multidrug transport system, ATPase and permease components	3e-67	51
2585690878	thiol reductant ABC exporter, CydD subunit	8e-20	40
2585694398	ABC-type nitrate/sulfonate/bicarbonate transport system, ATPase component	2e-16	35
2585693650	ABC-type antimicrobial peptide transport system, ATPase component	6e-14	35
2585688485	ABC-type cobalamin/Fe ³⁺ -siderophores transport systems, ATPase components	3e-13	34
2585692270	ABC-type metal ion transport system, ATPase component	1e-12	35
2585691994	oligopeptide/dipeptide ABC transporter, ATP-binding protein, C-terminal domain	2e-11	32
2585690655	cell division ATP-binding protein FtsE	2e-09	26
2585693906	ATP-binding cassette protein, ChvD family	4e-09	30
2585691220	carbohydrate ABC transporter ATP-binding protein, CUT1 family	5e-07	28
2585693259	amino acid ABC transporter ATP-binding protein, PAAT family	8e-07	37

e) AAA21389.1

# Acceso	Proteína	Valor E	% Ident
2585692243	ABC-type multidrug transport system, ATPase and permease components	4e-74	61
2585690878	thiol reductant ABC exporter, CydD subunit	4e-20	40
2585689165	ABC-type sugar transport systems, ATPase components	1e-18	42
2585692635	heme ABC exporter, ATP-binding protein CcmA	2e-16	36
2585688892	cobalt transport protein ATP-binding subunit	3e-16	37
2585692270	ABC-type metal ion transport system, ATPase component	4e-16	36

2585690655	cell division ATP-binding protein FtsE	4e-16	30
2585689237	ABC-type antimicrobial peptide transport system, ATPase component	2e-15	33
2585688472	ABC-type cobalamin/Fe ³⁺ -siderophores transport systems, ATPase components	2e-14	35
2585691220	carbohydrate ABC transporter ATP-binding protein, CUT1 family	5e-14	30
2585689065	amino acid ABC transporter ATP-binding protein, PAAT family	8e-12	32

f) AAA21390.1

# Acceso	Proteína	Valor E	% Ident
2585692245	two component transcriptional regulator, LuxR family	2e-29	37
2585692244	Response regulator containing a CheY-like receiver domain and an HTH DNA-binding domain	7e-26	37

Las alineaciones de las proteínas seleccionadas se presentan en el Anexo 1.

7. DISCUSIÓN

El estudio de las características fenotípicas de las actinobacterias ha llevado a observaciones interesantes en cuanto a su producción de metabolitos secundarios. Algunos trabajos con el género *Streptomyces* y su producción de micelio aéreo han demostrado que la producción de este se da después de la esporulación y está ligada, tanto al inicio de la diferenciación morfológica, como a la producción de metabolitos secundarios (Chapness y Chater, 1994). El segundo género más prolífico en cuanto a la producción de metabolitos secundarios con actividad biológica es *Micromonospora* (Bèrdy, 2005; 2012), sin embargo, su capacidad de producir micelio aéreo se ha considerado de poca importancia ya que se considera como una estructura “estéril”, es decir libre de esporas (Luedeman y Brodsky 1986, Tomita *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 2008). Más aún, solamente se han reportado 4 especies válidamente descritas que producen este micelio: *M. echinospora*, *M. rosaria*, *M. chersina* y *M. rifamycinica*, (Luedeman y Brodsky 1986, Tomita *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 2008) destacando a *M. echinospora* productora de un metabolito con importancia biológica. En el género *Micromonospora* no se ha definido si la producción de micelio aéreo está ligada a la esporulación.

El presente trabajo de tesis tuvo como objetivo el estudio de la formación de micelio aéreo en cepas del género *Micromonospora* aisladas del Golfo de California. Los resultados mostraron que 3 cepas presentaron esporulación y formación de micelio aéreo mientras que las otras 5 presentaron la formación de micelio aéreo sin haber esporulado. El medio de cultivo que favoreció mayoritariamente a esta formación fue el GYM con diferentes concentraciones de NaCl y SM (sales marinas), además del 2% de bicarbonato de calcio el cual es un componente traza que induce el crecimiento selectivo de actinobacterias y también ha demostrado ser útil en la inducción de la producción de metabolitos secundarios, micelio aéreo y esporulación en especies del género *Streptomyces* (Moncheva *et al.*, 2000; Gohar & El-Naggar, 2001).

Para conocer más acerca del mecanismo que el género *Micromonospora* usa para producir micelio aéreo y como primer paso para, en trabajos a futuro, estudiar si

esta característica está ligada a la producción de metabolitos secundarios, se utilizó un enfoque bioinformático. Dado que no se contaba con información genómica para las cepas aisladas en las cuales se observó la formación de micelio aéreo, se utilizaron los genomas de dos cepas relacionadas filogenéticamente con las cepas aisladas y cuyo genoma ha sido secuenciado y está disponible en bases de datos públicas. Mediante técnicas bioinformáticas, los genomas de *M. echinospora* (DSM 1040) y *M. aurantiaca* (ATCC 27029) fueron explorados para reconocer genes homólogos a los reportados en el proceso de producción de micelio aéreo en *Streptomyces coelicolor* (A3(2)), en específico, los genes pertenecientes al *cluster ram* (formación rápida de micelio aéreo) (Flårdh y Buttner, 2009). Los resultados de la búsqueda bioinformática sugieren la presencia de genes que codifican para proteínas relacionadas con los genes del *cluster ram* de *S. coelicolor* en ambos genomas de *Micromonospora* explorados. Los principales genes encontrados durante esta comparación fueron los responsables de transporte a través de la membrana del tipo ABC (ATP-binding cassette). La función principal de este tipo de proteínas es, como su nombre lo indica, el transporte activo de sustancias a través de la membrana celular, entre ellas los carbohidratos, lípidos, aminoácidos, iones metálicos, péptidos y algunas proteínas. Dentro del *cluster ram* está proteína se encuentra al final de la biosíntesis del *cluster* la cual es codificada por los genes *ramA* y *ramB* y su trabajo es exportar un residuo maduro de 21 aminoácidos de SapB fuera de la hifa (Kodani *et al.*, 2004).

Otros de los genes encontrados en esta comparación fueron los de las proteínas CheY y LuxR. La primera se encuentra dentro de un conjunto de genes reguladores de respuesta (RR, Response regulator) del ciclo de vida de *Streptomyces coelicolor* (Hutchings *et al.*, 2004), mientras que la segunda proteína (LuxR family) presenta una función de regulador transcripcional (Fuqua *et al.*, 1994). Ambas proteínas se encuentran dentro del sistema de dos componentes AbrA1/A2 y AbrC1/C2/C3 de *Streptomyces* el cuál es encargado de la regulación de la biosíntesis de antibióticos (Adamidis *et al.*, 1990; McKenzie y Nodwell, 2007; McKenzie y Nodwell, 2009). A pesar que ninguno de ellos se localiza dentro del *cluster ram*, se sabe que la producción de metabolitos secundario puede coincidir con el inicio de la

diferenciación morfológica, una vez terminado el desarrollo vegetativo y la activación de los genes de regulación (Champness & Chater, 1994).

Los resultados obtenidos en la comparación de los genomas para entender más acerca del ciclo de vida de *Micromonospora* y de los mecanismos de formación de micelio aéreo resultan interesantes. Aunque no se puede asegurar cual es el mecanismo de formación de micelio aéreo presente en el género *Micromonospora*, este estudio da la pauta para continuar con el esfuerzo de los estudios fenotípicos y genotípicos sobre este género. Se propone continuar con un análisis más detallado mediante pruebas en el laboratorio con cepas que presenten esta característica fenotípica de forma regular. Una opción sería el uso de oligonucleótidos específicos para amplificar genes del *cluster ram* y comprobar si las cepas contienen alguno de ellos. Mediante estudios de genómica y edición genética de los genes encontrados, sería posible estudiar si en realidad éstos se encuentran involucrados en el proceso de formación de micelio aéreo, ya que sabemos que este tipo de proteínas se han reportado dentro de los genomas de diferentes microorganismos y que no son exclusivas de este proceso.

Este trabajo sienta las bases de los estudios fenotípicos durante el ciclo de vida del género *Micromonospora*, para poder así avanzar hacia la respuesta clara de la hipótesis presentada.

8. CONCLUSIONES

Este trabajo demostró la capacidad de cepas del género *Micromonospora* aisladas del Golfo de California y de la Laguna de Términos para producir micelio aéreo. En el caso específico de cepas aisladas de ambientes marinos, fue necesario el uso de sales en el medio de cultivo para inducir la producción de este fenotipo.

Durante el escrutinio bioinformático de los genomas de dos cepas de *Micromonospora*, no aisladas de medio marino pero reportadas en bases de datos públicas, fue posible la identificación de genes con similitud a aquellos encargados de codificar proteínas involucradas en la formación de micelio aéreo en el ciclo de vida de *Streptomyces coelicolor*. Sin embargo, una identificación *in silico* no determina ontología genética, por lo tanto, se requiere de más estudios para afirmar que las secuencias encontradas pertenecen a proteínas involucradas en este metabolismo.

Esta tesis presenta una primera aproximación al estudio de características fenotípicas en el género *Micromonospora* que pueden estar relacionadas con la producción de metabolitos secundarios. Los resultados son alentadores y sugieren que la producción de micelio aéreo observada en las cepas de *Micromonospora* estudiadas en este trabajo podrían utilizar mecanismos similares a los presentados por *S. coelicolor* y por lo tanto esta característica fenotípica podría estar también relacionada con la producción de metabolitos secundarios, tal y como se ha demostrado en *Streptomyces coelicolor*.

8. PERSPECTIVAS

continuar con el estudio del género *Micromonospora* para determinar su ciclo de vida y así tener una idea de cómo se da la producción de metabolitos bioactivos que puedan tener un interés a nivel industrial, realizando estudios más profundos a los aislados y con esto abrir un nuevo campo de investigación, así como un nuevo reservorio de microorganismos como lo es el marino que se ha explotado muy poco y puede dar grandes resultados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adamidis, T. y W. Champness. 1992. Genetic analysis of *absB*, a *Streptomyces coelicolor* locus involved in global antibiotic regulation. *J Bacteriol.* 174:4622-4628.
2. Bérdy, J. 1995. Are actinomycetes exhausted as a source of secondary metabolites? Proceedings of the 9th International Symposium on the Biology of Actinomycetes. Part 1. Allerton Press, New York: 3-23 pp.
3. Bérdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites: a personal view. *J. Antibiot.* 58, 1-26.
4. Bredholt, H., Fjaervik, E., Johnsen, G., Zotcher, S. B. 2008. *Actinomycetes* from sediments in the Tronheilm Fjord, Norway: Diversity and Biological Activity. *Mar. Drugs.* 6, 12-24.
5. Bull, A., Ward, A. C., Goodfellow, M 2000. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 573-606.
6. Champness, W.C. y Chater, K.F. 1994. Regulation and integration of antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces* spp. *Regulation of Bacterial Differentiation.* P. Piggot, C. P. J. Moran & P. Youngman. Washington, D. C., American Soc. Microbiol. 61-93.
7. Chater, K.F. 1984. Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. *Microbial Development* (Shapiro, L. y Losick, R., ed), pp. 89-115.
8. Chater, KF y Chandra G. 2006. The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. *FEMS Microbiol Rev* 30, 2006, 651–672.

9. Colquhoun JA, Mexson J, Goodfellow M, Ward AC, Horikoshi K, Bull AT. 1998. Novel rhodococci and other mycolate actinomycetes from the deep sea. *Antonie van Leeuwenhoek*. 74(1-3), 27-40.
10. Feling, R. H., Buchanan, G. O., Mincer, T. J., Kauffman, C. A., Jensen, P. R., Fenical, W. 2003. Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, 355-357.
11. Fuqua, W.C., Winans, S.C., Greenberg, E.P. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176(2), 269-275.
12. Gontang, E.A., Fenical, W. & Jensen, P. 2007. Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl. and Environ. Microbiol.* 71, 3272-3282.
13. Goodfellow M. & Haynes J. A. 1984. Actinomycetes in marine sediments. In: Ortiz-Ortiz L., Bojalil L.F. y Yakoleff V. (eds), *Biological, biochemical and biomedical aspects of actinomycetes*. Academic Press, Orlando, 453-472 pp.
14. Goodfellow, M. y Fiedler H. P. 2010. A guide to successful bioprospecting: Informed by actinobacterial systematics. *Antonie van Leeuwenhoek*. 98, 119-142.
15. Gulve R. M. y Deshmukh A.M. Antimicrobial activity of the marine actinomycetes. *IMRJ*. 2012; 2(3):16-22.
16. Head, I. M. 2004. Recovery and Analysis of Ribosomal RNA Sequences from the Environment. *Ecology Manual* 2° ed. Kluwer Academic Publisher, USA; 139-142 pp.

17. Hirsch, A. M., Valdés, M. 2009. *Micromonospora*: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. *Soil Biol. & Biochem.* Doi: 10.1016/j. soilbio. 2009.11.023.
18. Holt, J.G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T., 2000. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9 ed. Lippencott, Williams & Wilkins, 653-655 pp.
19. Hongtao MA y Kendall K, 1994. Cloning and Analysis of a Gene Cluster from *Streptomyces coelicolor* that causes accelerated aerial mycelium formation in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.*, 176, 3800-3811.
20. Horan, A. C. y Brodsky, B. C. 1986. *Micromonospora rosaria* sp. Nov., no. Rev., the rosaramicin producer. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30, 565-568.
21. Huang, H., Jiasen, L., Yonghua, H., Zhe, F., Kaishan, Z., Shixiang, B. 2008. *Micromonospora rifamycinica* sp. nov., a novel actinomycete from mangrove sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58,17-20.
22. Hunter-Cevera J. C. 1998. The value of microbial diversity. *Current Opinion in Microbiology.* 1, 278-285.
23. Hutchings, M. I., Hoskisson, P. A., Chandra, G., Buttner, M. J. 2004. Sensing and responding to diverse extracellular signals? Analysis of the sensor kinases and response regulator of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiol.* 150, 2795-2806.
24. Imada, C., Koseki, N., Kamata, M., Kobayashi, T., Hamada-Sato, N. 2007. Isolation and characterization of antibacterial substances produced by marine actinomycetes in the presence of seawater. *Actinomycetologica.* 21, 27-31.

25. Jensen, P.R., Dwigth, R., Fenical, W. 1991. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1102-1108
26. Karthik, L., Gaurav K., Bhaskara Rao K.V. 2010. Diversity of marine actinomycetes from Nicobar marine sediments and its antifungal activity. *Int. J. Pharm. Sci.* 1, 199-203
27. Keijser, Bart J. F; Wezel, Gilles P. van; Canters, Gerard W., y Vijgenboom, Erik. 2002. Developmental regulation of the *Streptomyces lividans ram* genes: involvement of ramR in regulation of the *ramCSAB* operon. *J. Bacteriol. American Soc. Microbiol.* 4420-4429.
28. Kawamoto, I. 1992. Microbiological characteristics of genus *Micromonospora*. *Actinomycetologica.* 6, 91-104
29. Kennish J. M. 2001. Practical handbook of marine science. CRC Press. New Jersey, USA. 441-444 pp.
30. Koch, C., Kroppenstedt, R. M., Stackebrandt, E. 1996. Intrageneric relationships of the actinomycete genus *Micromonospora*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 383-387.
31. Kodain S., Hudson M. E., Durrant M. C., Buttner M. J., Nodwell J. R., Willey J. M. 2004. The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene ramS in *Streptomyces coelicolor*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101 (31), 11448-11453.
32. Kokare, C.R., K.R. Mahadik, S.S. Kadam y B.A. Chopade. 2004. Isolation of bioactive marine actinomycetes from sediments isolated from Goa and Maharashtra coastlines (west coast of India). *Indian J. Mar. Sc.* 248-256.

33. Lane D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. En Stackebrandt, E. y Goodfellow (eds). Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons, Nueva York, EUA. 115-175 pp.
34. Luedemann, G. M. & Brodsky, B. C. 1965. *Micromonospora carbonaceae* sp.nov., an everninomicin producing organism. Antimicrob. Agents. Chemother. 80, 47-52.
35. Madigan M.T., Martinko J. M., & Parker J. 2004. Brock. Biology of microorganisms. 10° ed. Pearson Prentice Hall, USA.
36. Madigan M. T. & Martinko J. M. 2009. Brock. Biology of microorganisms. 11th Ed. Pearson Prentice Hall, USA.
37. Magarvey N. A, Keller J. M., Bernan V., Dworkin M. & Sherman D. H. 2004. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. Appl. Environ. Microbiol. 70,7520-7529.
38. Maldonado L.A. 2002. Polyphasic taxonomy of members of the genus *Nocardia*. Tesis Doctoral, Universidad de Newcastle. Newcastle Upon Tyne, Inglaterra Reino Unido.
39. Maldonado L. A., Fenical W., Jensen P. R., Kauffman C. A., Mincer T. J., Ward A. C., Bull A. T. y 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.
40. Maldonado L. A., Stach J. E., Pathom-aree W., Ward A. C., Bull A. T. y Goodfellow M. 2005b. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. Antonie van Leeuwenhoek. 87,11-18.

41. Maldonado, L.A., Fragoso-Yáñez, D., Pérez-García, A., Rosellón- Druker, J. & Quintana, E.T. 2009. Actinobacterial diversity from marine sediments collected in México. *Antonie van Leeuwenhoek* 95,111-120.
42. McKenzie, N.L. and J.R. Nodwell. 2007. Phosphorylated AbsA2 negatively regulates antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* through interactions with pathway-specific regulatory gene promoters. *J. Bacteriol.* 189:5284-5292.
43. Mincer T. J., Jensen P. R., Kauffman C. A. & Fenical W. 2002. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 68,5005-5011.
44. Monciardini, P., Sosio, M., Caletti, L., Chiocchini, C. y Donadio, S. 2002. New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes. *FEMS Microbiol. and Ecol.* 42, 419-429.
45. Moron, R., González, I. y Genilloud, O. 1999. New genus-specific primers for the PCR identification of members of the genera *Pseudonocardia* and *Saccharopolyspora*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 149-162.
46. O'Connor, T. J., Kanellis, P., Nodwell, Jr. 2002. The *ramC* gene is required for morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* and expressed in a cell type-specific manner under the direct control of *RamR*. *Mol. Microbiol.* 45 (1), 45-57.
47. Orskov, J. 1923. Investigations into the morphology of the ray fungi. Levin and Munksgaard, Copenhagen, Denmark.
48. Pedrós-Alió, C. 2006. Marine microbial diversity: can it be determined?. *Trends. Microbiol.* 14, 257-263.

49. Pisano, M. A., Sommer, M. J. y Brancaccio, L. (1989) Isolation of bioactive actinomycetes from marine sediments using rifampicin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31, 609-612.
50. Qiu, D., Ruan, J., Huang, Y. 2008. Selective isolation and rapid identification of members of the genus *Micromonospora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5593-5597
51. Salazar, O., Moron, R. & Genilloud, O. 2000. New genus-specific primers for the PCR identification of members of the genus *Saccharomonospora* and evaluation of the microbial diversity of wild-type isolates of *Saccharomonospora* detected from soil DNAs. *Int. J. Syst. and Evol. Microbiol.* 50, 2043-2055.
52. Salazar, O., González, I. & Genilloud, O. 2002. New genus-specific primers for the PCR identification of new isolates of the genera *Nocardiopsis* and *Saccharothrix*. *Int. J. Syst. and Evol. Microbiol.* 52, 1411-1421.
53. Sogin M. L., Morrison H. G., Huber J. A., Welch D. M., Huse S. M., Neal P. R., Arrieta J. M. & Herndl G. J. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 32,12115-12120.
54. Stach J.E.M, Maldonado L.A., Masson D.G., Ward A.C., Goodfellow M. & Bull A.T. 2003. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. *Microbiol.* 69, 6189-6200.
55. Stackebrandt E., Rainey F. A., & Ward-Rainey N. L. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria classis nov.* *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47,479-491

56. Stackebrandt, E., Liesack, W., Witt, D. 1992. Ribosomal RNA and rADN Sequence Analyses. *Gene* 115(1-2): 255-260.
57. Suarez, J. & Hardisson, C. 1985. Morphological characteristics of colony development in *Micromonospora chalcea*. *J. Bacteriol.* 162, 1342-1344.
58. Tan, G.Y.A., Ward, A.C. y Goodfellow, M. 2006. Exploration of *Amycolatopsis* diversity in soil-using genus-specific primers and novel selective media. *Sys. and Appl. Microbiol.* 29, 557-569.
59. Tomita, K. Hoshino, Y., Ohkusha, N., Tsuno, T., Miyaki, T. 1992. *Micromonospora chersina* sp. nov. *Actinomycetologica.* 6, 21-28.
60. Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald F. G., Chater, K. F. van Sinderen, D. 2007. Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 495-548.
61. Weyland H. (1969). Actinomycetes in North Sea and Atlantic Ocean Sediments. *Nature*, 223, 858.
62. Weyland, H. 1981. Distribution of actinomycetes on the sea floor. *Zentbl. Bakteriol. Suppl.* 11:185-193
63. Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe W. J. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 6578-6583.
64. Woese, D. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221-271.

11. APENDICES

11.1) A: Medios de Cultivo

Todos los medios de cultivo se prepararon con agua y fueron esterilizados en autoclave a 121°C por 15 minutos a 15 lb de presión.

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

Agua marina	
Sales marinas	35g
Agua destilada	1000 mL

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

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

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

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

12. Anexo 1

1) ABC-type multidrug transport system, ATPase and permease components (AAA21389.1)

```
>lcl|2501792517 MicroAuranti_DRAFT_56780 ABC-type multidrug transport system,
ATPase and permease components [Micromonospora aurantiaca ATCC
27029]
Length=616

Score = 154 bits (389), Expect = 1e-040, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 159/447 (36%), Positives = 215/447 (48%), Gaps = 31/447 (7%)

Query 162 SLITPLGALVALALVDVWVALCVLTGLPALALLRSFARDTGATVAAYQRTQSLIASRLL 221
      +L+ +GA+ +L D +AL L PAL L ++R A QR ++ ++
Sbjct 147 TLVMLVGAVASLFFTDWALALVGLAVFPALFALNVVYSRRMAPRQARAQRLRAEVSGIAH 206

Query 222 EALEGADTIGAAGTGERERARVLAPLAELAAQGRHMWALHGRALGRSGVLVPLL----- 275
      E+ +GA + G +E AR A A + R GR GV PLL
Sbjct 207 ESFDGALVVKTMGREAQETAR----FASRAGELRDALISVGRL---RGVFDPLLETLPSL 259

Query 276 -TLAATAVGGLRLAAGELSVGDLLAVGR-YAQLTAGVGAASLLGAIVRAREARRRTREL 333
      TLA VG +R G +SV +L++V + L V A +L + R+ R R +
Sbjct 260 GTLAVLVVGAIRYRQGAISVTELVSVAF LFTVLAFPVRAIGWVLAELPRSVAGWDRVRRV 319

Query 334 ERMTATV-YGTRRLPP--NGPGELRLCGVRVLRG-----GREVLRAGGVRVPGGSTVA 383
      T + YGTR L P P L V G +VL VP G TVA
Sbjct 320 LDATGEMPYGTRTLDPATREPATLAFDDVHFAYEPAEAHLPGAQVLGEVTFVTPAGKTVA 379

Query 384 VVGRSGAGKSVLAAVAGRLIDPDEGYVLLDGVRLDRLTHEALRTEVAYAFERPVLGEGTI 443
      +VG +GAGKS +A++A RL+DP G V LDGV LT +L VA + P ++ T+
Sbjct 380 LVGPTGAGKSTIASLAVRLVDPGAGRVTLDGVDERELTAASLAGTVALVAQVPFVFDDTV 439

Query 444 AEAVADGARRSSRERVRQAARAAGADGFVRRLLPHGYDTPLPR--APLSGGEHQRLGLARA 501
      +A + V A R A ADGFV LP G DT + LSGG+ QRL LARA
Sbjct 440 RANIALDRAGIGDDEVWAALRLAEADGFVAALPDGLDLMVGERGTSLSGGQRQLTLARA 499

Query 502 FAHAGRLLVLDATSSLDTATEHEVDLALRRSVR---PGTRLVVAHRPSVADRADLVLWL 558
      A RLLVLDATSS++D E + LR P + LVVA+R + AD V+++
Sbjct 500 LAGRPRLLVLDATSAVDPVVEAAILAGLRAPTGGAPASILVWAYRRATIALADEVIYV 559
```

```
>lcl|2501793158 MicroAuranti_DRAFT_63200 ABC transporter, CydDC cysteine exporter
(CydDC-E) family, permease/ATP-binding protein CydD [Micromonospora
aurantiaca ATCC 27029]
Length=559

Score = 108 bits (269), Expect = 3e-025, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 87/222 (39%), Positives = 120/222 (54%), Gaps = 2/222 (1%)

Query 344 RRLPPNGPGELRLCGVRVLRGGREVL RAGGVRVPGGSTVAVVGRSGAGKSVLAAVAGRLI 403
      RR P G GE+R GV V LR + V G VA++G SGAGKS L + +
Sbjct 324 RRPAPRGRGEIRFEGVTWAYDRTTALRDVTLTVRPGDRVAIIGPSGAGKSTLLNLLLFV 383

Query 404 DPDEGYVLLDGVRLDRLTHEALRTEVAYAFERPVLGEGTIAEAVADGARRSSRERVRQAA 463
      P G V +DGV L + +A R E+A+ +R L G++A+ + GA + + A
Sbjct 384 APTSGRVTVDGVDLAGVDLDAWRRELAWVPQRAHLFAGSLADNIRLGAPETPDAALAAAV 443

Query 464 RAAGADGFVRRLLPHGYDTPLPR--APLSGGEHQRLGLARAFAHAGRLLVLDATSSLDTA 521
      A D V LP G DT L LS G+ QR+ LARAF +++LD+ T+ LD+A
Sbjct 444 TGAALDEVVGALPDGLDTRLGERGHGLSSGQRQVALARAFIRDAPIVLLDEPTARLDSA 503

Query 522 TEHEVDLALRRSVRPGTRLVVAHRPSVADRADLVLWLEDGQV 563
      +E V A RR V T L+VAHRP++ AD +L +EDG+V
Sbjct 504 SEAVVLDATRRLVAGRTALLVAHRPALLADADRILRVEDGRV 545
```


2) ABC-type multidrug transport system, ATPase and permease components (AA21388.1)

```
>lcl|2501788766 MicroAuranti_DRAFT_19180 ABC-type multidrug transport system,
ATPase and permease components [Micromonospora aurantiaca ATCC
27029]
Length=660
```

```
Score = 129 bits (324), Expect = 4e-032, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 171/510 (34%), Positives = 243/510 (48%), Gaps = 66/510 (13%)
```

```
Query 123 AAVSRLTNQVEIARDSF----AGLVLTLSRFVFTAAGALLGLLSLHPALLVWVLPPLAAG 178
A VSRL N V A+ +F +G+V + V TA GA+L +LS ++ +VL P+
Sbjct 143 ALVSRLNNDVLDGAQRAFTSTLSGVVSNVIQLVLTGAML-VLSWQITVMALVLLPI--- 197

Query 179 LALFLV----TLRPMAAAQRRALAADEALG----EHAASARAALRDLTACGTGPGAERHG 230
F++ R +A R + D + E A A L L GA
Sbjct 198 ---FIIPARRVGRRLAEITRESYNLDKMNATMTERFGVAGALLVKLF-----GAPEVE 248

Query 231 ADLVADAAAAARTLAGWAAVRTAALGVAGHLPVLALLVAVEWLRGHGVSV-GALLGAFTY 289
AD A A R + +A+ + VA L V +L A+ + G ++V GA+
Sbjct 249 ADRFARRAERVRDIGIQSAMYSRTFFVA-MLLVASLAQALTYGVGGWLAVTGAVSAGTVV 307

Query 290 LVQSLLPALHTLMTALGAAGSRL---LVVLDRI---LGPEPEPEPEPEPEPELGSGL 343
+ LL L+ +TAL + LV DR+ L P +P+ P P G+G
Sbjct 308 KLALLLTRLYGPLTALSNNVRVDVMSALVSFDRVFEVLDLRPSIAEKPDVAVPVR-GNG-- 364

Query 344 PEPEPASEPESGPSTASASAAAFVHTAAAPAVELRSVTL SYGVRAEPVLDALDLRVAPG 403
E PS A S A+ L V+ EPVL + V PG
Sbjct 365 -RVEFRDVRFRYPSAAEVSLAS-----LEEVTLDRTVNEPVLRGVSFAVEPG 411

Query 404 EHLAVVGPSPGIGKSTLTRLVAGTLAPSRGEVVRVAGRVVTRPAAELAAALRV---LVPQDA 460
+ +A+VGPSPG GKSTL+ L++ S G+V V G V R A LA+LR +V QD+
Sbjct 412 QMVALVGPSPGAGKSTLSMLISRIYDVS DGQVLVGG--VDMRDAT-LASLRDEIGVVTQDS 468

Query 461 YVFSGTVGDNLAYLRTDPSPAELDAAVEAFGLAPLVERL-GGLDATV--RPAELSPGERQ 517
++F T+ +NL Y + D + E+ AA+ +A LV L GLD TV R S GE+Q
Sbjct 469 HLFHETIRENLRYAKPDATDDEIWAALAGAQVADLVRALPDGLDTTVGERGYRFSGGKEQ 528
```

```
>lcl|2501788709 MicroAuranti_DRAFT_18600 cell division ATP-binding protein FtsE
[Micromonospora aurantiaca ATCC 27029]
Length=220
```

```
Score = 78.2 bits (191), Expect = 8e-017, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 65/213 (31%), Positives = 101/213 (47%), Gaps = 22/213 (10%)
```

```
Query 381 VTLSYGVRAEPVLDALDLRVAPGEHLAVVGPSPGIGKSTLTRLVAGTLAPSRGEVVRVAGRV 440
VT +Y + P LD + + + GE + +GPSG GKST+ +L+ + P++G V V G+
Sbjct 1 VTKTYPKASRPSLDNVSVSIEKGEFVFFIGPSGSGKSTIIKLLLHEVTPNKRGRVWVNGKD 60

Query 441 VTGRPAAELAAALRVLPQDAYVFSGTVGDNLAYLRTDPSPAELDAAVEAFGLAPLVER-- 498
VT + + R + G V + L + + A+E G V R
Sbjct 61 VTSMRSWKRPHFRRSI-----GCVFQDFRLLPNRTAYENVAFALEVIGTKAVARRV 112

Query 499 -----LGGLDATVRPAELSPGERQLVALVRAYLSPAPLLLLDEATCHLDPASEARA 549
LGG + P ELS GE+Q VA+ RA+++ +LL DE T +LDP +
Sbjct 113 VPEVLELVGLGGKEHRY-PHELSSGGEQQRVAVARAFVNRPLILLADEPTGNLDPDTSIEI 171

Query 550 EKAL--AGRSGLVWVAHRLSSAVRADRTLVLVD 580
+ L R+GT VW+ S+ V R V++
Sbjct 172 MRLLDRINRTGTTVVMVTHDSNIVNQMRRRVIE 204
```

3) Response regulator containing a CheY-like receiver domain and HTH binding domain (AAA21390.1)

```
>lcl|2501787249 MicroAuranti_DRAFT_03960 Response regulator containing a CheY-like receiver domain and an HTH DNA-binding domain [Micromonospora aurantiaca ATCC 27029]
Length=201
```

```
Score = 102 bits (254), Expect = 3e-027, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 78/201 (39%), Positives = 106/201 (53%), Gaps = 4/201 (2%)
```

```
Query 4 MVRIAVVHDEKLLRSALVQLLRSDDTLDVSSHCLDADGPELSAALP--ADVCVVDGECLT 61
++R+ + DE+L+R AL LL + ++V +H D L AAL DV V+D E
Sbjct 1 VIRVLLADDEELIRLALAAALLDLEPDIIEVVAHARDGRS-ALDAALAHRPDVAVLDMLEMP 59

Query 62 -GPEDAGAGRLRARYGDRLVWLATAKRPGVLRRAFDGGALGLVDKNAPAHRLITAVHTVA 120
G + A RA G V+L RP LR A G G + K AP L + V
Sbjct 60 PGGVEVADELTRALPGCAPVILTGHGRPAQLRPALTAGVRGFLAKGAPGGALADVIRRVH 119

Query 121 RGERFLDETLTVALLKGAEMPLTTRELGVLTLASQGAPIAEIAARLHLSRGTVRNYMATA 180
G R++D L L E PLT REL L LA G P+A IA R HL+ GTVRN+++
Sbjct 120 SGARYVDPALAADALTLPECPLTPRELETLRLAELGTPVAVIARRTHLAAGTVRNHLSAC 179

Query 181 VRKVGARNRVDAIRIVQSAGW 201
V+K+GA +R +A+R + AGW
Sbjct 180 VQKLGAAADRAEAVRRAREAGW 200
```

```
>lcl|2501789931 MicroAuranti_DRAFT_30780 two component transcriptional regulator, LuxR family [Micromonospora aurantiaca ATCC 27029]
Length=212
```

```
Score = 58.9 bits (141), Expect = 1e-011, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 58/203 (29%), Positives = 94/203 (46%), Gaps = 17/203 (8%)
```

```
Query 4 MVRIAVVHDEKLLRSALVQLLRSDDTLDVSSHC-LDADGPELSAALPADVCVVDGECLTG 62
M+R+ ++ D +++R L LL+S ++V L + AL DV ++D
Sbjct 1 MIRVFLDDHEVRRGLADLLQSSGDIIEVVGESGLAQEAARRIPALRPDVAILDARL--- 57

Query 63 PEDAGAGRLR-ARYGDRLV---VLATAKRPGVLRRAFDGGALGLVDKNAPAHRLITAVHT 118
P+ G R R D + +L + + L A GA G V K L+ AV
Sbjct 58 PDGNGIDVCRDVRADVSSSIKGLILTSYEDDEALFAAIMAGAAGYVLKQIRGTDLVDVAVRR 117

Query 119 VARGERFLDETLTVALLK---GAEMP-----LTTRELGVLTLASQGAPIAEIAARLHLS 169
VA G+ LD +T +L+ G E P LT +E +L ++G EIA ++ L+
Sbjct 118 VAAGQSLLDPAITTRVLERIRSGVEQPRELKSLTEQERRILEYVAEGLTNREIAGKMFLA 177

Query 170 RGTVRNYMATAVRKVGARNRVDA 192
TV+NY+++ + K+G R A
Sbjct 178 EKTVKNYVSSVLAKLGLERRTQA 200
```

