



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA, UNIDAD SISAL

**EVALUACIÓN DEL ANTAGONISMO QUÍMICO ENTRE
BACTERIAS AISLADAS DE SEDIMENTOS DE LA
CIÉNAGA DE SISAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:

QUÍMICA

PRESENTA:

ANA. LUISA RUIZ HERNÁNDEZ



SISAL, YUCATÁN, MÉXICO.

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Rachel Mata Essayag

VOCAL: Profesor: Mario Alberto Figueroa Zaldívar

SECRETARIO: Profesor: Alejandra Prieto Davó

1er. SUPLENTE: Profesor: Alberto Ortega Vázquez

2° SUPLENTE: Profesor: Edgar Axel Donjuan Guerrero

**EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLÓ EN LA FACULTAD DE QUÍMICA,
UNAM, SISAL, YUCATÁN, MÉXICO.**

ASESORA DEL TEMA:

DRA. ALEJANDRA PRIETO DAVÓ

SUPERVISORA TÉCNICA:

Q.A. NORMA ANGÉLICA MÁRQUEZ VELÁZQUEZ

SUSTENTANTE:

ANALUISA RUIZ HERNÁNDEZ

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	II
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABLAS.....	V
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	
2.1 Actinobacteria.....	5
2.2 Actinomicetos en ambientes marinos.....	6
2.3 Papel ecológico de los actinomicetos en ambientes marinos.....	7
2.4 Sedimentos y nutrientes.....	7
2.5 Área de estudio.....	8
3. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	12
3.1 HIPÓTESIS.....	13
3.2 OBJETIVOS	
3.2.1 Objetivo general.....	14
3.2.2 Objetivos específicos.....	14
4. METODOLOGÍA	
4.1 Zona de muestreo.....	15
4.2 Aislamiento de las bacterias.....	17
4.3 Determinación de Gram por el método de KOH.....	21
4.4 Evaluación del antagonismo entre las bacterias aisladas	
4.4.1 Siembra en cuadrícula.....	21
4.4.2 Siembra en cruz.....	22
4.4.3 Siembra en paralelo.....	22
4.5 Preparación de los cultivos líquidos y extracción orgánica.....	23
4.6 Prueba de antagonismo por difusión en disco.....	23
4.7 Bioautografía.....	24
4.8 Fraccionamiento primario en columna abierta.....	27
5. RESULTADOS	
5.1 Aislamiento de las cepas.....	29
5.2 Pruebas de antagonismo	
5.2.1 Siembra en cuadrícula.....	30
5.2.2 Siembra en cruz.....	32
5.2.3 Siembra en paralelo.....	32
5.3 Extracción orgánica.....	37
5.4 Cromatografía en capa fina de los extractos orgánicos.....	39
5.5 Prueba de difusión en disco.....	39
5.6 Bioautografía.....	41
5.7 Fraccionamiento primario en columna abierta.....	42
6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	45
7. REFERENCIAS.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

rADN	ADN ribosomal
H ₂ O	agua
cel	células
cm	centímetro
TLC	cromatografía en capa fina
CH ₂ Cl ₂	diclorometano
CO ₂	dióxido de carbono
g	gramos
ha	hectárea
KOH	hidróxido de potasio
h	horas
km	kilómetros
L	litros
MeOH	metanol
μL	microlitros
μS	microsiemens
mg	miligramos
mL	mililitro
mmHg	milímetros de mercurio
mV	milivoltios
min	minutos
NCA	número de colección asignado
ppt	partes por mil
pH	potencial de hidrógeno
rpm	revoluciones por minuto
NaSO ₄	sulfato de sodio
TSA	tripteína soya agar
UFC	unidades formadoras de colonias

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Productos naturales producidos por actinomicetos aislados de manglares.	10
2	Localización de la Reserva Estatal El Palmar, al norte de la península de Yucatán.	15
3	Zonas de muestreo en la Reserva Estatal El Palmar.	16
4	Muestras de los sedimentos recolectados.	17
5	Sedimentos secos.	17
6	Estampado del sedimento en medio de cultivo marino A.	19
7	Distribución de sedimentos de la zona de muestreo “mangle afuera”.	19
8	Aislamiento de la cepa NCA 139 en los medios de cultivo marino sólido y líquido.	20
9	Pruebas para determinar el antagonismo.	22
10	Distribución de discos en la caja de Petri para las pruebas de difusión en disco.	24
11	Cromatografía en capa fina para la selección del sistema de elución adecuado.	25
12	Curva de crecimiento del patógeno <i>Staphylococcus aureus</i> en la fase exponencial.	26
13	Curva de crecimiento del patógeno <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en la fase exponencial.	26
14	Placas de TLC inoculadas con el patógeno <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	27
15	Montaje de columna para el fraccionamiento primario del extracto orgánico.	28
16	Cepas puras aisladas en medio de cultivo marino.	30
17	Siembra en cuadrícula para determinar el antagonismo.	31
18	Siembra en cuadrícula de las cepas que mostraron antagonismo.	31
19	Ensayo de antagonismo entre la cepa NCA 145 y la cepa NCA 143.	32
20	Ensayo de antagonismo entre la cepa NCA 120 y la cepa NCA 126.	32

Figura	Página
21 Ensayo de antagonismo entre la cepa NCA 151 y la cepa NCA 160.	33
22 Ensayo de antagonismo entre la cepa NCA 144 y la cepa NCA 140.	33
23 Ensayo de antagonismo entre la cepa NCA 137 y la cepa NCA 131.	34
24 Ensayo de antagonismo entre la cepa NCA 119 y la cepa NCA 131.	34
25 Cepas dominantes elegidas para las pruebas de antagonismo químico.	37
26 Extracción por partición con AcOEt y extractos obtenidos de las cepas reactivadas.	38
27 Cromatografía en capa fina de los extractos orgánicos de AcOEt.	39
28 Cepas que mostraron antagonismo químico en las pruebas de difusión en disco.	40
29 Actividad contra el patógeno <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en el bioensayo con los extractos de AcOEt.	41
30 Actividad contra el patógeno <i>Staphylococcus aureus</i> en el bioensayo con los extractos de AcOEt.	41
31 Fraccionamiento en columna abierta y fracciones obtenidas.	43
32 Cromatografía en capa fina de las fracciones del extracto de acetona de la cepa NCA 151.	43
33 Actividad de las fracciones primarias del extracto de acetona de la cepa NCA 151 contra el patógeno <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	44
34 Actividad de las fracciones primarias del extracto de acetona de la cepa NCA 151 contra el patógeno <i>Staphylococcus aureus</i> .	44

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Composición de los medios de cultivo marino en el estampado de los sedimentos.	18
2	Relación de las cepas aisladas.	29
3	Cepas que mostraron antagonismo en los ensayos de siembra cruzada y en paralelo.	35
4	Cepas dominantes seleccionadas para las pruebas de antagonismo químico con los extractos orgánicos.	36
5	Rendimiento de los extractos orgánicos de las cepas seleccionadas con base en los ensayos de antagonismo.	38
6	Resultados de los ensayos de antagonismo químico en la prueba de difusión en disco.	40
7	Resultados de las pruebas de bioautografía.	42

1. INTRODUCCIÓN

Más del 70% del agua que cubre la Tierra está conformada en su mayoría por océanos; los sedimentos marinos conforman dos tercios del área de la superficie de la Tierra (Magarvey *et al.*, 2004) y entre el 90 y 98% de la biomasa del océano está constituida por microorganismos (Sogin *et al.*, 2006). La gran biodiversidad de microorganismos que existe tanto en el agua dulce como en el agua salada se debe a las variaciones en la disponibilidad de nutrientes, la temperatura, el pH y otros factores que modifican el número y tipo de microorganismos presentes en un ecosistema (Hunter–Cevera., 1998). La base de los ecosistemas marinos se encuentra en el fito y bacterioplancton, este último con abundancias de hasta un millón de células por mL de agua de mar (Fenical y Jensen, 2006).

Las bacterias son microorganismos capaces de degradar y producir una gran cantidad de compuestos químicos, y su abundancia en los sedimentos marinos es 1000 veces mayor que en agua de mar (10^9 cel/g de sedimento) (Surajit *et al.*, 2006; Fenical y Jensen, 2006), en donde se han identificado alrededor de 23, 000 especies de bacterias distintas (Amaral–Zettler *et al.*, 2010; Venter *et al.*, 2004). Las bacterias tienen una gran capacidad de adaptación, lo cual permite su cultivo en condiciones de laboratorio para la obtención de grandes cantidades de biomasa (Madigan, 2003).

En las últimas décadas se ha observado que los actinomicetos forman una parte metabólicamente activa de la población microbiana endémica del sedimento (Weyland, 1969; Moran *et al.*, 1995); así mismo, han demostrado una gran capacidad para formar poblaciones estables en diferentes hábitats, siendo una fuente importante de compuestos bioactivos (Kin, 2006; Manivasagan *et al.*, 2013).

Los actinomicetos están distribuidos a lo largo del océano y se encuentran en zonas intermareales (Goodfellow y Williams, 1983), en el agua de mar (Subramani y Aalbersberg, 2012), en animales (Subramani y Mathivana, 2009), en plantas (Castillo *et al.*, 2005), en esponjas marinas (Zhang *et al.*, 2008) y en los sedimentos de los océanos (Jensen *et al.*, 2005). La adaptación de los actinomicetos en el ambiente marino resalta la importancia de estos ambientes en el probable descubrimiento de nuevas especies y productos naturales (Fenical y Jensen, 2006). Además en los últimos 20 años se han descubierto numerosos actinomicetos marinos con actividades metabólicas específicas en su ambiente natural (Maldonado *et al.*, 2005, Mincer *et al.*, 2002).

Los actinomicetos marinos se pueden encontrar en cualquier parte de los océanos (Kin, 2006), se ha obtenido una gran diversidad de actinomicetos recolectados de sedimentos marinos del Golfo de México y del Golfo de California (Maldonado *et al.*, 2009). Algunos actinomicetos marinos como las especies *Dietzia maris*, *Rhodococcus erythropolis* y *Kocuria erythomyxa* fueron aislados de sedimentos de una isla en Japón (Inagaki *et al.*, 2003) y de las islas Marianas (Bull *et al.*, 2005).

Por otro lado, los actinomicetos son también parte del microbioma de organismos marinos, también se han encontrado nuevos grupos de actinomicetos en esponjas de la Gran Barrera de Coral, pertenecientes a las familias *Micrococceae*, *Dermatophilaceae* y *Gordoniaceae* (Hill *et al.*, 2004; Jensen *et al.*, 2005); así mismo, se ha demostrado que estos son fuente de nuevos metabolitos bioactivos (Russell, 2004). Los actinomicetos aislados de muestras recolectadas en ambientes marinos

representan ecosistemas únicos que no pueden ser encontrados en ninguna otra parte (Kin, 2006).

La incidencia de infecciones provocadas por patógenos resistentes a antibióticos continúa aumentando por lo que se requiere del descubrimiento de nuevos antibióticos (Alsokar *et al.*, 2010). Así, cada vez más investigadores han cambiado al estudio de diferentes ecosistemas para la obtención de nuevos compuestos farmacéuticos entre ellos, los océanos (Thornburg *et al.*, 2010), los desiertos (Bull y Asenjo, 2013), las áreas polares (Liu *et al.*, 2013) y los manglares (Amrita *et al.*, 2012), por lo que es crucial el descubrimiento de nuevos grupos de actinomicetos provenientes de lugares no explorados (Kin, 2006).

El litoral costero del estado de Yucatán está dominado por humedales de manglar, éstos forman parte de lagunas costeras, ciénagas, petenes y playas. Los bosques de manglar tienen una cercana relación con las descargas de agua subterránea, lo cual determina su productividad primaria, fisonomía y trayectorias de restauración ecológica (Zaldivar-Jiménez *et al.*, 2004).

En suelo en esta región está formado por rocas carbonatadas, estas características kársticas de la península de Yucatán favorecen que el agua fluya formando una red de ríos subterráneos. Las peculiaridades de los sistemas kársticos costeros incluyen procesos geoquímicos específicos relacionados a una zona en donde éstos se mezclan (Graizbord *et al.*, 2004). Por otro lado, la geohidrología de la costa norte de la Península de Yucatán determina el desarrollo de manglares que pueden ser de tipo húmedo o seco (Echeverría-García, 2003).

Con base en lo antes mencionado y a las características ambientales únicas de la ciénega de Sisal, este trabajo está enfocado al estudio de la diversidad de bacterias Gram positivas cultivables y al análisis de sus posibles interacciones antagonistas, con el objetivo de seleccionar aquellas cuya interacción pueda resultar en el posterior aislamiento de productos naturales biológicamente activos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Actinobacteria

La clase actinobacteria es de gran interés debido a que algunas especies de esta clase producen más del 50% de los antibióticos descubiertos a la fecha (Bérdy, 2012). La orden de los Actinomycetales está constituida por bacterias Gram positivas con alto contenido de guanina y citosina en su ADN (Stackebrandt *et al.*, 1997); la mayoría son aerobias y su morfología varía desde bacilos cortos, cocos, hasta aquellas que presentan hifas fragmentadas o micelio ramificado y bien diferenciado (Brenner *et al.*, 2006).

Estas bacterias se desarrollan en sedimentos marinos y su crecimiento puede verse afectado por interacciones con otras poblaciones (sinérgicas, antagónicas, etc.), así como por las características físicas y químicas de su ambiente (Fenical y Jensen, 2006). Como resultado de estas interacciones, estos microorganismos pueden formar un micelio radial para colonizar sustratos y producir metabolitos secundarios con actividad biológica (Jensen *et al.*, 2008). La producción de dichas sustancias es una estrategia que les permite inhibir o regular el crecimiento de diversos microorganismos en una población, proporcionando así una ventaja de supervivencia (Surajit *et al.*, 2006).

Los actinomicetos representan el grupo de bacterias más prolífico para la industria farmacéutica (Tiwari y Gupta, 2012), siendo entre el 35 y 80% de las cepas estudiadas químicamente pertenecientes a los géneros *Salinispora* y *Marinispora*, con importante actividad antitumoral o antibiótica (Fenical y Jensen, 2006; Kwon *et al.*, 2006; Gulve y Deshmukh, 2012). Así mismo, el género *Streptomyces* se

considera de gran importancia debido a que producen cerca del 90% de los antibióticos conocidos en el mundo (Castillo *et al.*, 2005; Manivasagan *et al.*, 2013).

2.2 Actinomicetos en ambientes marinos

Los actinomicetos pueden ser aislados de sedimentos, plantas y animales marinos. Los estudios sobre diversidad microbiana mediante análisis genético de 16s rDNA demuestran que los actinomicetos son las bacterias dominantes en los sedimentos marinos (Gulve y Deshmukh, 2011). Entre ellos, el género *Salinispora*, el primero en considerarse estrictamente marino debido a que requiere sodio para su crecimiento, es de gran relevancia ya que se este se han obtenido varios compuestos con actividad biológica (Maldonado *et al.*, 2005a). Se ha demostrado que la expresión genética de los metabolitos secundarios está relacionada con factores ambientales, como la competencia por espacio físico, la escases de alimento, la protección del organismo hospedero, la comunicación entre células, etc. (Wietz *et al.*, 2013). Por otra parte, se han desarrollado diversas técnicas con la finalidad de obtener y cultivar nuevas especies de actinomicetos marinos (Hames-Kocabas y Uzel, 2012). Así, cuatro de los géneros de actinobacterias predominantes en ambientes marinos son: *Micromonospora*, *Rhodococcus*, *Nocardia* y *Streptomyces* (Goodfellow *et al.* 1983). Para el desarrollo óptimo de los actinomicetos a una densidad de población entre 10^8 y 10^{11} UFC se requiere una temperatura de 25°C (mesófilos) y a pH alcalino entre 6 y 9 (Rothschild y Mancinelli, 2001).

2.3 Papel ecológico de actinomicetos en ambientes marinos

Los actinomicetos juegan un papel importante en diversos procesos de degradación de materia orgánica en el océano (Das *et al.*, 2006). Por ejemplo, la remineralización, la inmovilización de nutrientes y la fijación y liberación de nitrógeno molecular (Lam, 2006). Estos procesos son de suma importancia para entender tanto su potencial de producción de metabolitos secundarios, como su potencial para la biorremediación dada la capacidad que poseen para degradar compuestos contaminantes (Machado-Días, 2013).

2.4 Sedimentos y nutrientes

Los sedimentos están conformados por partículas provenientes de la erosión de rocas, restos orgánicos de organismos o compuestos precipitados químicamente, están cubiertos por una capa de agua, ya sea del océano, río o cualquier cuerpo de agua (Tarbuck y Lutgens, 2005). En las zonas costeras, aproximadamente el 50% del carbono orgánico que precipita en los sedimentos proviene de la productividad primaria, mientras que el otro 50% se deriva de restos de organismos, aportes terrígenos y excreciones extracelulares de eucariotas (Kördel *et al.*, 1997).

El sedimento marino es un ambiente rico en minerales y tiene una gran abundancia de bacterias que usan la materia orgánica como alimento (Ruble *et al.*, 1978), esto lo convierte en el mayor reservorio de materia orgánica del mundo (Calva y Torres-Alvarado, 2000). La concentración de nutrientes de los sedimentos no es constante y ésta se ve influenciada por el tipo y tamaño de sedimento dominante: a menor tamaño de grano, mayor será el contenido de nutrientes debido a que las

moléculas se adsorben con mayor facilidad a los granos finos generando a su vez una mayor superficie de colonización (Cammen, 1982).

2.5 Área de estudio

Los manglares representan la vegetación dominante de la costera en las regiones tropicales y subtropicales. Son ecosistemas con características de ambientes terrestres y acuáticos, ya que se localizan en las zonas de transición entre la tierra, los ríos y el mar (Ghizelini *et al.*, 2012). Los bosques de manglares están compuestos por un pequeño número de especies de árboles y arbustos, y su vegetación está controlada principalmente por la hidrología, la geografía y el clima de la región (Kathiresan y Bingham, 2001). El tipo de plantas varía de acuerdo a su adaptación al tipo de sedimentos, los cambios de temperatura, los nutrientes, los niveles de oxígeno y la salinidad; formando así, zonas de vegetación con patrones característicos de los manglares. Los sedimentos de estos ecosistemas son los precursores de sus bosques y de todo lo que vive en ellos, y su diversidad sugiere una gran adaptación a posibles impactos ambientales (Hooper *et al.*, 2005).

La luz, el agua y el barro rico en materia orgánica que están presentes en los manglares, son importantes para la producción de grandes cantidades de biomasa (Holguin y Bashan, 2007). Los manglares favorecen el depósito de grandes cantidades de carbono en los sedimentos, estuarios y océanos cercanos (Kathiresan y Bingham, 2001), lo cual proporciona las bases para una gran red trófica con el desprendimiento de nutrientes (Holguin *et al.*, 2001).

Las bacterias ocupan una gran variedad de nichos y se consideran fundamentales para el funcionamiento de los manglares (Holguin y Bashan, 2007). Con frecuencia

han sido consideradas como productoras de sustancias antibacterianas que permiten mantener la estabilidad ecológica de múltiples ecosistemas marinos (Fredrickson y Stephanopoulos, 1981). Las interacciones antagónicas de tipo bacteria–bacteria corresponden a un mecanismo que puede ayudar a mantener la composición de especies bacterianas a nivel microescala (Long y Azam, 2001), ya sea mediante la competición por los nutrientes, el espacio, la luz y/o a través de la producción de diversos metabolitos secundarios bioactivos, entre ellos sustancias con actividad biológica (Fredrickson y Stephanopoulos, 1981).

Los manglares se han convertido en una fuente importante para el aislamiento de actinomicetos y la identificación y biosíntesis de sus metabolitos secundarios (Dong–Bo *et al.*, 2014). Estos ecosistemas han llamado la atención de los investigadores debido a su especial ubicación entre el mar y la tierra, la facilidad de muestreo y su riqueza en diversidad biológica (Hong *et al.*, 2009). Recientemente, los estudios sobre metabolitos secundarios obtenidos de actinomicetos provenientes de manglares ha aumentado debido a la novedad de sus estructuras químicas y su potencial medicinal (Dong–Bo *et al.*, 2014). Por ejemplo, se aisló un nuevo alcaloide naftiridínico con propiedades antitumorales de la bacteria *Streptomyces albogriseolus* (**Figura 1a**) de sedimentos de la reserva nacional de manglares en Fujian (Li *et al.*, 2010). Así mismo, un derivado antiviral de la pirazina se aisló del actinomiceto *Jishengella endophytica* (**Figura 1b**) que se obtuvo de la planta *Acanthus illicifolius* de un manglar en Hainan (Wang *et al.*, 2012).

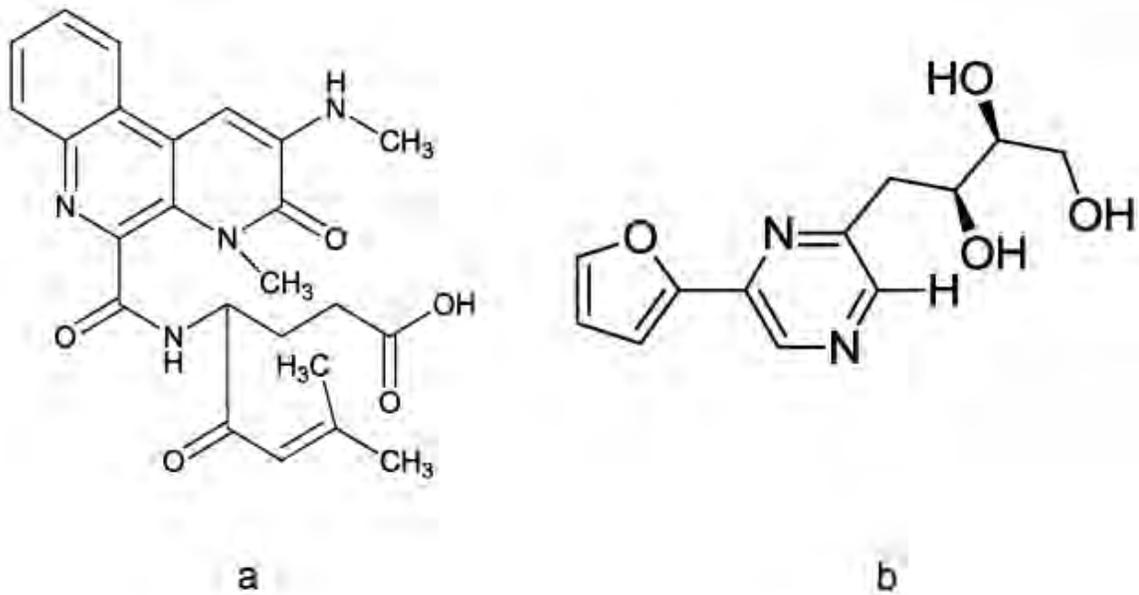


Figura 1: Productos naturales producidos por actinomicetos aislados de manglares: (a) estructura de un alcaloide de la benzonaftiridina, (b) estructura de un derivado de la pirazina (Dong-Bo *et al.*, 2014).

A pesar de que México cuenta con 11, 122 km de litoral, la diversidad de actinomicetos marinos que se encuentran en éstos océanos ha sido poco estudiada (Maldonado *et al.*, 2009; Torres-Beltrán, 2012). La Reserva Estatal El Palmar, en la península de Yucatán, está situada a 55 km de la ciudad de Mérida y comprende los municipios de Celestún y Hunucmá. Los poblados cercanos a esta reserva son: el Puerto de Sisal, el Puerto de Celestún y la Reserva de la Biosfera Ría Celestún. El Palmar abarca una extensión de 50,177.39 ha y la mayor superficie de la Reserva corresponde al ecosistema de manglar. Sus cuerpos de agua dulce con vegetación se conforman por la selva baja inundable, petenes y manglares, formando extensas cuencas palustres donde la entrada de agua salada es mínima. Las áreas inundadas de agua salada con vegetación están ampliamente representadas por los bosques de manglar, que sobreviven aún en condiciones hipersalinas (Echeverría-García, 2003). El Palmar está localizado en las marismas,

conformadas por el sistema palustre salobre o ciénaga, y que se prolonga paralelamente a la costa, desde el límite Occidental de la Reserva a la altura de Celestún, hasta su límite que corresponde al puerto de Sisal (Echeverría-García, 2003).

El suelo en esta región es de características calizo-cársticas de gran permeabilidad y sujetas a constante erosión (INEGI, 1984). La Península tiene características hidrológicas que la hacen diferente del resto del país, esto debido a la ocurrencia de precipitaciones, la topografía del terreno y los escasos escurrimientos superficiales, aunados a una alta permeabilidad en la región (Echeverría-García, 2003).

3. JUSTIFICACIÓN

La diversidad microbiana que existe en el océano es mucho mayor que en otros ecosistemas (Fenical *et al.*, 1999); sin embargo, solo se ha logrado caracterizar menos del 1% de su totalidad (Tiwarly y Gupta, 2012). Los actinomicetos son las bacterias más prolíficas para la producción de metabolitos secundarios bioactivos con potencial microbiano, herbicida, antiparasitario, pesticida y para la obtención de enzimas útiles en tratamientos de biorremediación (Karigar y Rao, 2011; Deepa *et al.*, 2013).

Es necesario conocer la diversidad cultivable de las comunidades bacterianas de zonas costeras y su relación entre las características ambientales de su localidad y los compuestos químicos que producen. De esta manera se puede obtener información importante para futuras investigaciones, además de aumentar la probabilidad de obtención de cepas novedosas e inusuales.

La Península de Yucatán constituye una región caracterizada por su riqueza y diversidad de especies, con variedad de ecosistemas y con un amplio litoral (Montaño-Arias *et al.*, 2010). Esto la convierte en una zona ideal para la búsqueda de nuevos actinomicetos marinos.

Debido a que la Ciénaga de Sisal es un ambiente muy característico, en donde la entrada de agua dulce es subterránea y tiene contacto con los sedimentos kársticos, además de ser un ambiente poco estudiado, este trabajo se enfoca al estudio de los microorganismos cultivables presentes en los sedimentos de dicho ecosistema y en su capacidad de producción de metabolitos secundarios con actividad biológica.

3.1 HIPÓTESIS

Dada la abundancia de actinobacterias en los ambientes relacionados con los marinos, es factible aislar de sedimentos de la Ciénaga de Sisal bacterias Gram positivas que sean susceptibles a ser clasificadas por el método de KOH de manera preliminar y que éstas muestren interacciones antagónicas.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo general

Estudiar la diversidad de bacterias Gram positivas cultivables de la Ciénaga de Sisal, sus interacciones antagónicas y de inhibición de algunos patógenos con el propósito de generar información acerca de la biodiversidad de microorganismos en esta zona.

3.2.2 Objetivos específicos

- Aislar y cultivar una serie de cepas Gram positivas a partir de sedimentos de la Ciénaga de Sisal.
- Determinar la actividad antagónica entre las bacterias aisladas y contra algunos patógenos.
- Obtener los extractos orgánicos de los cultivos bacterianos selectos y establecer su potencial antimicrobiano.

4. METODOLOGÍA

4.1 Zona de muestreo

El muestreo de los sedimentos para el aislamiento de los organismos se realizó en la Reserva Estatal El Palmar al norte de la península de Yucatán (**Figura 2**). Las zonas en las que se tomaron las muestras fueron en la parte de la raíz del mangle, afuera del mangle y en el canal, como se describe en la **Figura 3**.

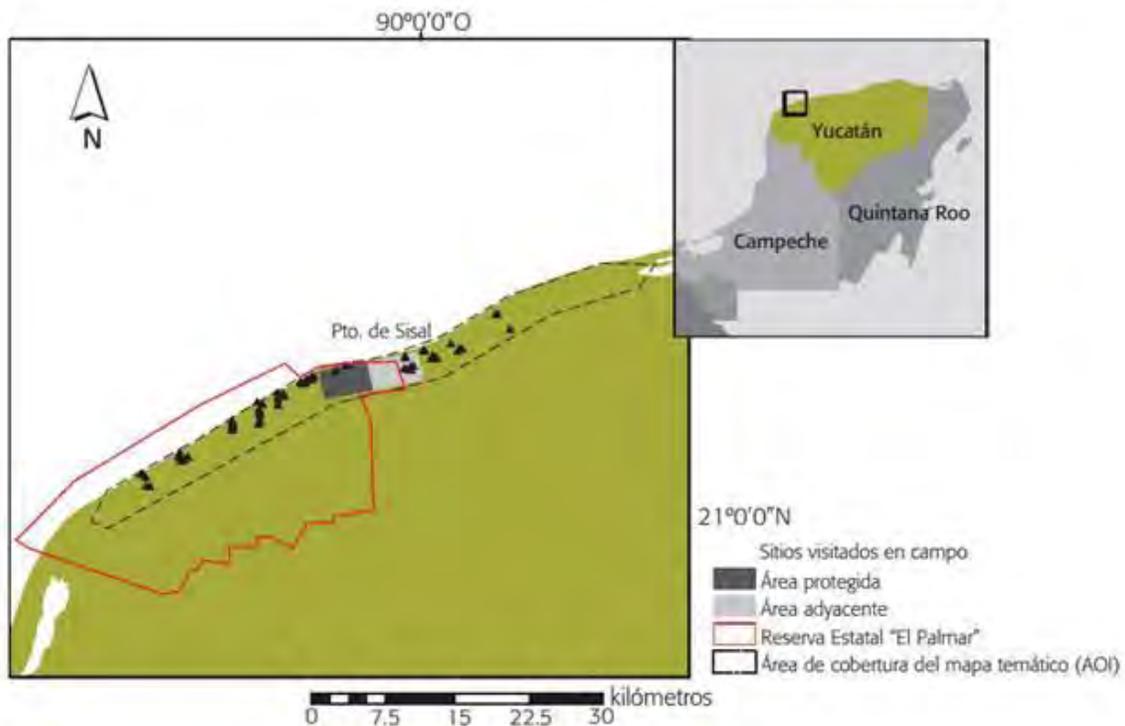


Figura 2: Localización de la Reserva Estatal El Palmar, al norte de la península de Yucatán (Rioja-Nieto, 2015).



Figura 3: Zonas de muestreo en la Reserva Estatal El Palmar.

Las condiciones ambientales y del agua durante el muestreo se registraron con un medidor multiparámetro YSI Professional Plus: temperatura ambiente: 35°C; temperatura del agua: 22.4 °C; presión: 762.2 mmHg; Oxígeno disuelto: 7.7 mg/L; salinidad: 3.48 ppt; pH: 8.25; potencial de oxidación-reducción: 37 mV y conductividad: 6063 uS/cm.

De cada zona se tomaron tres muestras y se colocaron en bolsas estériles Nasco Whirl Pak (**Figura 4**). La profundidad a la que se realizó el muestreo fue de aproximadamente 45 cm y la cantidad de muestra recolectada fue de 6 g. Las muestras se transportaron en una hielera y se refrigeraron a 4°C en el laboratorio A de la Unidad de Química en Sisal, Yucatán.



Figura 4: Muestras de los sedimentos recolectados.

4.2 Aislamiento de bacterias

Los sedimentos obtenidos en el muestreo se colocaron en cajas de Petri semi cerradas para eliminar el agua y mediante una campana de flujo laminar a temperatura ambiente y durante una semana y media (**Figura 5**).

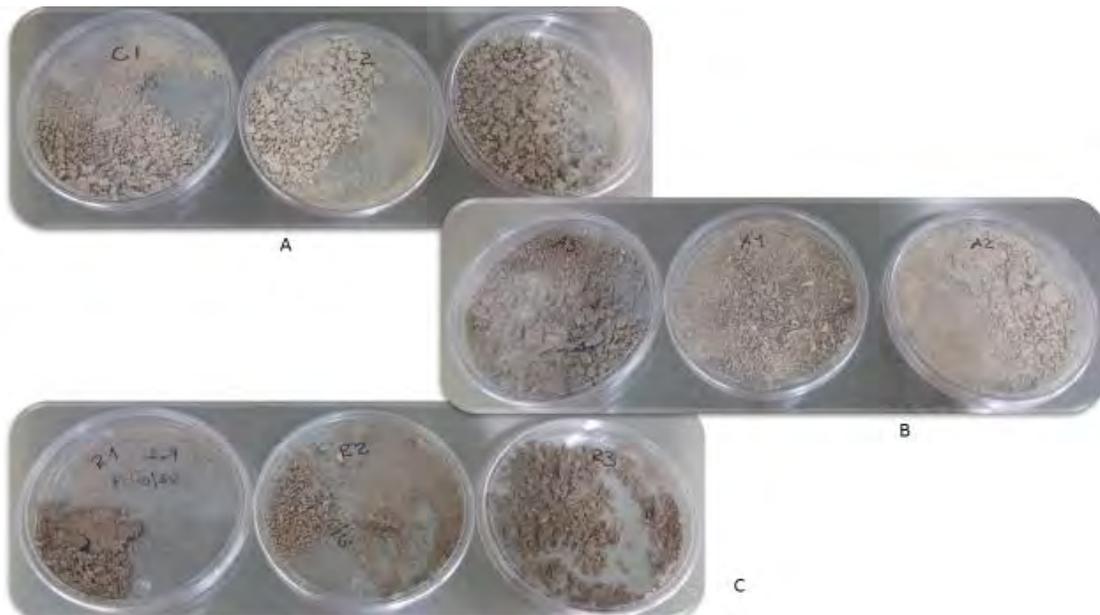


Figura 5: Sedimentos secos: (a) sedimentos de la zona de canal, (b) sedimentos de afuera del mangle, (c) sedimentos de la raíz del mangle.

Una vez secos los sedimentos, se tomó una pequeña cantidad con una esponja rectangular estéril y se realizó el estampado del sedimento en una caja de Petri con medio de cultivo marino, siguiendo la circunferencia en dirección de las manecillas del reloj y con la finalidad de que la concentración de sedimento fuera disminuyendo (**Figura 6**).

Los medios de cultivo marino utilizados para los estampados tenían la siguiente composición: almidón, extracto de levadura, peptona, agar y agua de mar (Jensen *et al.*, 2005) a diferentes proporciones (**Tabla 1**). A estos medios de cultivo se les agregaron los siguientes antibióticos: gentamicina (10 mg/mL), ciclohexamida (10 mg/mL) y rifampicina (5 mg/mL), dando lugar a la distribución que se muestra en la **Figura 7**.

Tabla 1

Composición de los medios de cultivo marino utilizados en el estampado de los sedimentos

	Medios de cultivo			
	A	B	C	D
Almidón	5 g	10 g	10 g	---
Extracto de levadura	2 g	4 g	4 g	---
Peptona	1 g	2 g	2 g	---
Agar	18 g	18 g	18 g	18 g
Agua de mar	1 L	1 L	1 L	1 L
Gentamicina	1 mL	1 mL	---	---
Ciclohexamida	10 mL	10 mL	10 mL	---
Rifampicina	---	---	1 mL	---

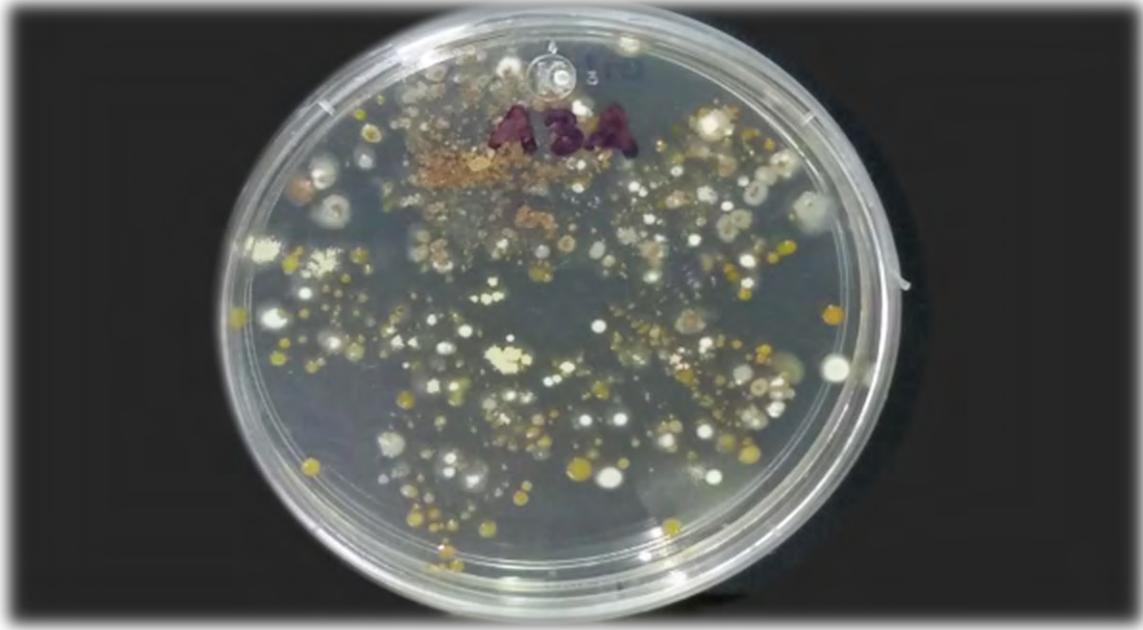


Figura 6: Estampado del sedimento en medio de cultivo marino A.

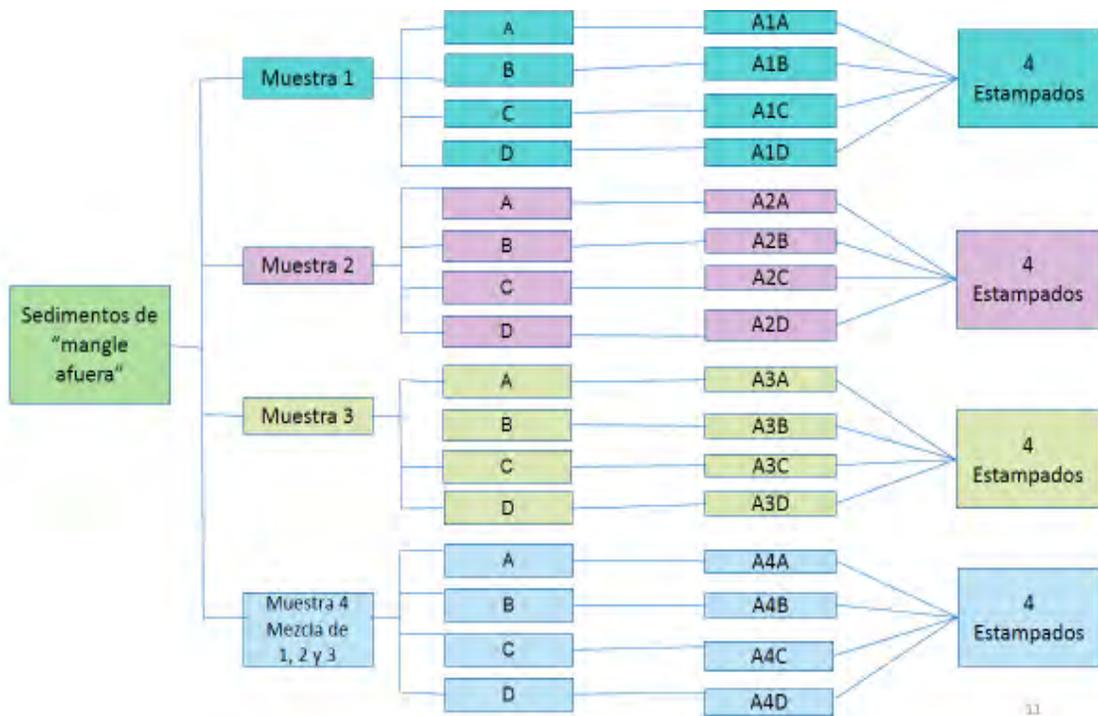


Figura 7: Distribución de los sedimentos de la zona de muestreo “mangle afuera” para realizar el estampado en los diferentes medios de cultivo (A, B, C y D).

Después de realizar el estampado, las cajas de Petri se dejaron en una incubadora a 27°C durante una semana. El crecimiento de colonias se pudo observar después de las 72 h de incubación, y el aislamiento de las bacterias se realizó a partir de los 5 días de incubación. De todos los estampados, se seleccionaron aquellas colonias con apariencia de actinomicetos: colonias rugosas, con formas plegadas y filamentos ramificados (Fenical *et al.*, 2008), y aquellas que presentaban zonas de inhibición o algún tipo de pigmentación.

Las colonias seleccionadas fueron resembradas en cajas de Petri con medio de cultivo marino sin antibiótico, utilizando como método de siembra el de estriado. Una vez verificada la pureza de la bacteria, se sembró en un medio de cultivo líquido para incrementar su biomasa (**Figura 8**). Finalmente, se tomaron 500 µL del cultivo en medio líquido y se depositaron en un criotubo con 500 µL de glicerol a una concentración final del 20% para su conservación a -80°C.



Figura 8: Aislamiento de la cepa NCA 139 en los medios de cultivo marino sólido y líquido.

4.3 Determinación de bacterias Gram por el método de KOH

La determinación de Gram de las bacterias se realizó mediante la prueba de KOH (Buck, 1982), la cual consiste en tomar una pequeña cantidad de la colonia en un portaobjetos y añadir una gota de KOH al 3%, mezclar por 60 segundos y observar si hay cambio en la viscosidad de la cepa. Las bacterias Gram positivas no presentan cambio en su viscosidad, mientras que las Gram negativas se tornaron viscosas y con apariencia de pegamento (Buck, 1982).

4.4 Evaluación del antagonismo entre las bacterias aisladas

Una vez aisladas y purificadas las cepas bacterianas, se sometieron a pruebas de interacción antagónica como se indica a continuación:

4.4.1 Siembra en cuadrícula

Para esta prueba se tomó con el asa estéril una pequeña cantidad de la cepa de interés y se trazó en la caja de Petri con medio de cultivo marino una línea vertical, se esterilizó de nuevo el asa y se tomó la misma cepa para trazar una línea horizontal que cruzara con la línea vertical. Este procedimiento se hizo con todas las cepas a evaluar, sembrando en una misma caja cuatro cepas diferentes (**Figura 9a**). Posteriormente las cajas se dejaron incubar por 5 días a 27°C y se seleccionaron las cepas que presentaron algún tipo de inhibición en el punto de cruce, ya sea por retardo del crecimiento, inhibición, modificación en la pigmentación o inhibición de la esporulación, y se procedió a sembrar en cuadrícula únicamente las dos cepas que presentan antagonismo entre ellas (**Figura 9b**).

4.4.2 Siembra en cruz

Para evitar el arrastre de las cepas durante la siembra en cuadrícula, se realizó la siembra en cruz, la cual consistió tomar una pequeña cantidad de las cepas de interés con el asa estéril y trazar una línea de forma vertical en la caja de Petri con medio marino. Se esterilizó el asa de nuevamente y se tomó la otra cepa seleccionada y se trazó una línea horizontal, deteniendo el trazo justo antes del cruce con la línea vertical de la cepa anterior y se siguió el trazo horizontal hasta el otro lado de la caja para tener una siembra en forma de cruz; finalmente se toca el cruce de ambas líneas con el asa (**Figura 9c**).

4.4.3 Siembra en paralelo

Esta siembra se realizó para estudiar el comportamiento de las cepas sin contacto directo. Para ello con el asa estéril se tomó la primera cepa y se trazó en la caja de Petri con medio de cultivo marino una línea vertical. Posteriormente se esterilizó el asa y se tomó la otra cepa de interés, trazando una línea vertical paralela a la sembrada anteriormente (**Figura 9d**).

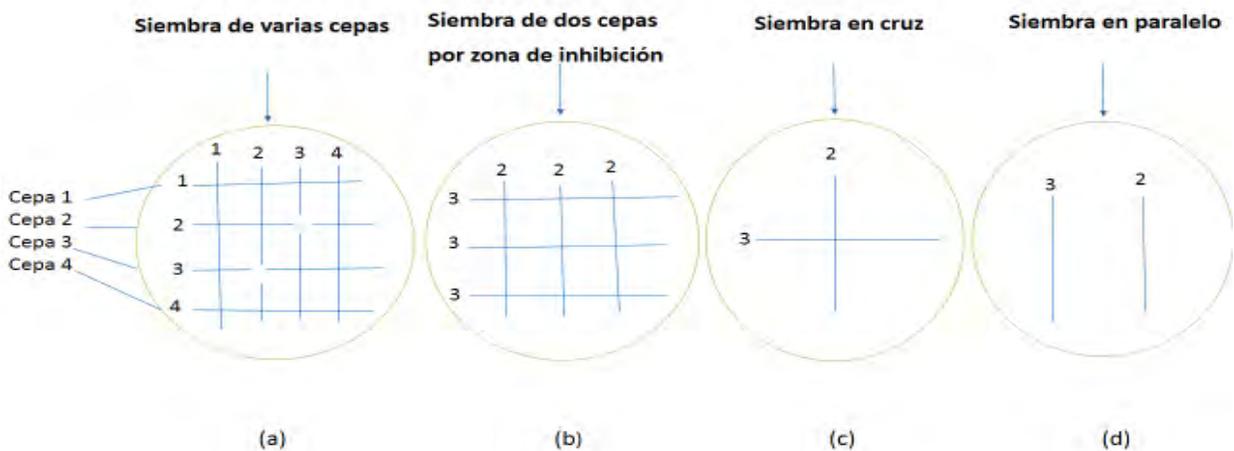


Figura 9: Pruebas para determinar el antagonismo.

4.5 Preparación de los cultivos líquidos y extracción orgánica

Con base en los ensayos de interacción, se seleccionaron aquellas cepas que mostraron algún tipo de antagonismo en las siembras de cuadrícula y cruz para su estudio químico preliminar. Para esto, la bacteria criogenizada se reactivó en 1L de medio de cultivo marino líquido y su biomasa se dejó en agitación por una semana a 27°C y a 106 rpm. Al término de este periodo se agregaron 20 g de amberlita XAD4 y se dejó en agitación por 3 h; posteriormente se filtró el medio de cultivo con una gasa estéril y a la mezcla resina-biomasa se le agregaron 300 mL de acetona y se dejó en agitación durante 12 h, cumplido este periodo se repitió el proceso de filtrado y las fracciones de acetona se combinaron y se evaporaron a presión reducida en un rotavapor Buchi R-215. Posteriormente, la resina se dejó en agitación con 600 mL de MeOH durante 6 h, se filtró nuevamente con una gasa estéril y el disolvente se evaporó en el rotavapor. La fase acuosa del primer filtrado (medio de cultivo) se colocó en un embudo de separación y se extrajo con 600 mL de AcOEt por duplicado. Finalmente, la fase orgánica de la extracción se secó con NaSO₄ anhídrido y se evaporó a presión reducida. Así, de cada organismo se obtuvieron tres extractos: AcOEt, acetona y MeOH.

4.6 Prueba de antagonismo por difusión en disco

Para los ensayos de antagonismo los extractos de AcOEt de las cepas de interés, se disolvieron en CH₂Cl₂-MeOH (1:1) a una concentración de 0.05 mg/μL y los extractos de acetona y MeOH en agua estéril a una concentración de 0.1 mg/μL. Por otra parte las bacterias sensibles en las pruebas de antagonismo fueron sembradas de forma masiva en las cajas de Petri. Para ello, 100 μL de la cepa cultivada en medio líquido se colocaron sobre una caja Petri con medio de cultivo

sólido y con la ayuda de un hisopo estéril, se distribuyó el inóculo girando constantemente la caja de Petri hasta cubrir en su totalidad la superficie de agar, las cajas se dejaron en incubación por 24 h a 35°C. Se colocaron sobre la caja de Petri previamente inoculada, los discos esterilizados con 10 µL de los extractos de AcOEt, MeOH y acetona de la cepa dominante. Como controles negativos se utilizaron discos impregnados con 10 µL de CH₂Cl₂-MeOH (1:1) y 10 µL de agua estéril (**Figura 10**). Finalmente las cajas se sellaron y se incubaron a 35°C por 24 h.



Figura 10: Distribución de discos en la caja de Petri para las pruebas de difusión en disco.

4.7 Bioautografía

Para realizar las pruebas de bioautografía y el posterior fraccionamiento del extracto orgánico de interés, se realizaron, en primer lugar, las pruebas de cromatografía en capa fina para elegir el sistema de elución adecuado. Las placas cromatográficas utilizadas eran de aluminio recubiertas con sílica gel.



Figura 11: Cromatografía en capa fina para la selección del sistema de elución adecuado.

Una vez elegido el sistema de elución (CH_2Cl_2 -MeOH 95:5), se realizó una nueva placa cromatográfica con los extractos de AcOEt. Para el bioensayo, se aplicaron también 5 μL de rifampicina (1 mg/mL) como control positivo y 5 μL de CH_2Cl_2 -MeOH (1:1).

Para las pruebas de bioautografía, se emplearon los patógenos *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. En un trabajo alterno realizado en el grupo de trabajo, se estableció la curva de crecimiento de los patógenos mencionados (**Figura 12 y 13**), y se determinó el tiempo óptimo de crecimiento de los mismos y el volumen del medio de cultivo necesario para obtener una concentración de unidades formadoras de colonias conocida (Vidal-Torres, en preparación). Así, se vertieron 10 mL de agua destilada con agar (soporte de agar) en la caja de Petri y antes de que solidificara por completo se colocó la placa de TLC sobre éste. Luego se agregaron a 10 mL de medio TSA (tripteína soya agar), 330 μL del patógeno a

utilizar, se selló la caja de Petri y se dejó en incubación por 24 h (**Figura 14**). Al término de este tiempo, se agregó 1 mL del agente revelador cloruro de 2, 3, 5-trifenil-2H-tetrazolio al 1%.

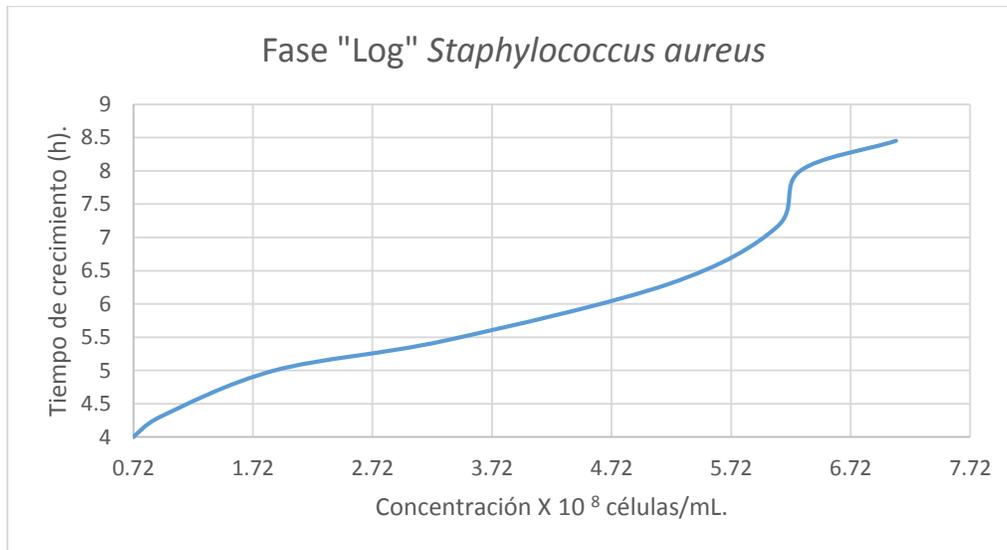


Figura 12: Curva de crecimiento del patógeno *Staphylococcus aureus* en la fase exponencial (Vidal-Torres, en preparación).

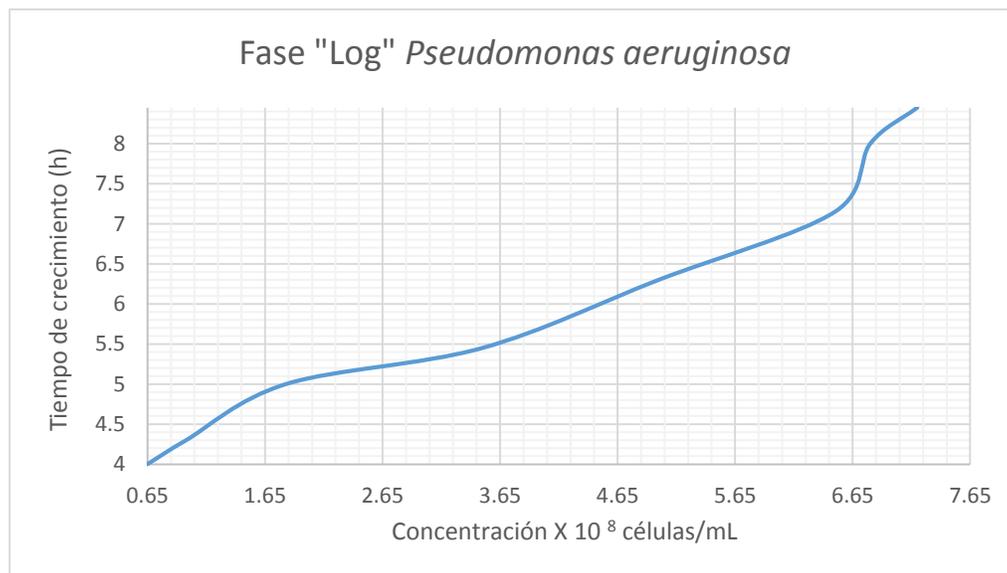


Figura 13: Curva de crecimiento del patógeno *Pseudomonas aeruginosa* en la fase exponencial (Vidal-Torres, en preparación).



Figura 14: Placas de TLC inoculadas con el patógeno *Pseudomonas aeruginosa*.

4.8 Fraccionamiento en columna abierta

El fraccionamiento primario del extracto orgánico se realizó utilizando una columna abierta (bureta de 50 mL) empacada con silica gel como fase estacionaria (**Figura 15**). El extracto orgánico se disolvió con una mezcla CH_2Cl_2 -MeOH (95:5). Como fase móvil se empleó la mezcla que fue definida previamente en las pruebas de cromatografía en capa fina. El sistema de elución se mantuvo constante (sistema isocrático) durante todo el fraccionamiento. Las fracciones obtenidas se recolectaron en tubos de ensayo (aproximadamente 3 mL, 22 fracciones por extracto). Finalmente todas las fracciones se evaporaron y se realizó nuevamente el ensayo de bioautografía.

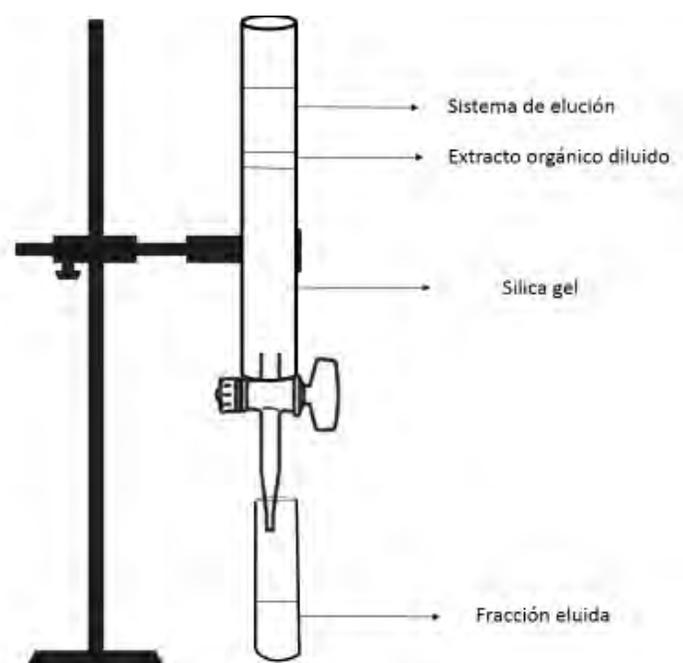


Figura 15: Montaje de la columna para el fraccionamiento primario del extracto orgánico.

5. RESULTADOS

5.1 Aislamiento de cepas

Se aislaron un total de 114 cepas bacterianas: 38 provenientes de la zona de muestreo de afuera del mangle, 45 de la zona de canal y 31 de la zona de raíz (**Tabla 2**). El aislamiento final se realizó en medio de cultivo marino y todas las cepas aisladas resultaron Gram positivas en la prueba de KOH.

Tabla 2

Relación de las cepas aisladas

Zona de muestreo	Medio de cultivo del estampado*	Cepas aisladas por muestra**				Total de cepas aisladas por zona de muestreo	
		1	2	3	4		
Afuera	A	3	6	1	5	15	38
	B	4	3	2	8	17	
	C	2	2	1	1	6	
Canal	A	1	13	5	5	24	45
	B	2	2	2	2	8	
	C	1	3	4	5	13	
Raíz	A	2	4	3	7	16	31
	B	2	1	2	3	8	
	C	1	2	1	3	7	

* Tabla 1

** Figura 5



Figura 16: Cepas puras aisladas en medio de cultivo marino.

5.2 Pruebas de antagonismo

5.2.1 Siembra en cuadrícula

En el primer escrutinio se evaluaron las 114 cepas aisladas utilizando la siembra en cuadrícula y clasificándolas por zona de muestreo. De éstas cepas, se seleccionaron 21 que mostraron algún tipo de antagonismo (**Figura 17a**). En el segundo escrutinio se probaron las 21 cepas con las demás cepas aisladas, un total de 67 cepas mostraron antagonismo en la segunda prueba (**Figura 17b**).



Figura 17: Siembra en cuadrícula para determinar antagonismo, (a) primer escrutinio en la zona de canal, (b) segundo escrutinio.

Finalmente, con las cepas que mostraron actividad en el segundo escrutinio, se realizaron una serie de pruebas entre la cepa dominante contra la inhibida. De estos experimentos, se seleccionaron 24 cepas que mostraron antagonismo (**Figura 18**).

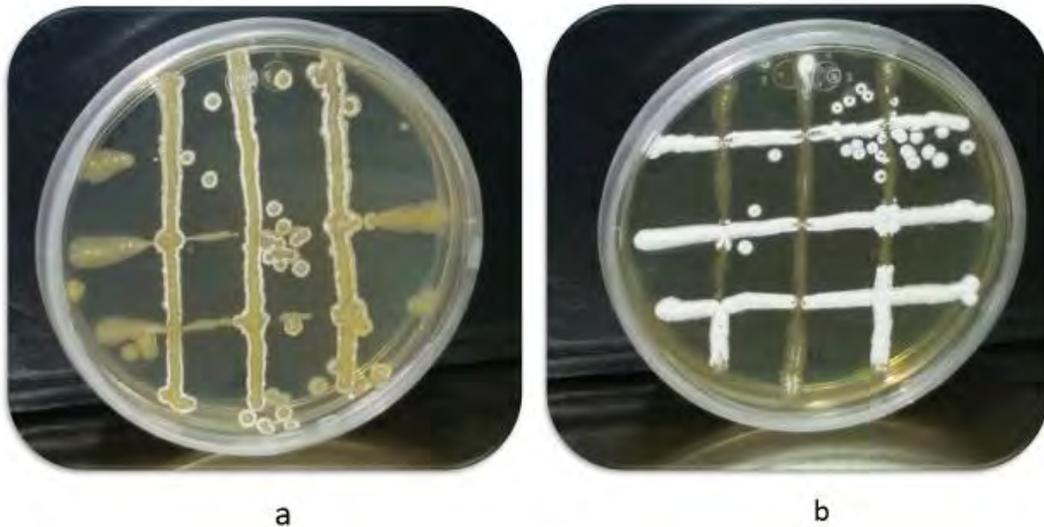


Figura 18: Siembra en cuadrícula de cepas que mostraron antagonismo, (a) inhibición de crecimiento, cepa NCA 210 contra la cepa NCA 220, (b) inhibición de esporulación, cepa NCA 183 contra la cepa NCA 180.

5.2.2 Siembra en cruz

Con el objetivo de confirmar los efectos antagónicos de las 24 cepas seleccionadas en los ensayos anteriores, se realizaron dos pruebas más mediante la siembra en cruz y en paralelo (**Figura 19–24**). Solo 12 cepas mostraron actividad antagónica, los resultados de estos ensayos se resumen en la **Tabla 3**.



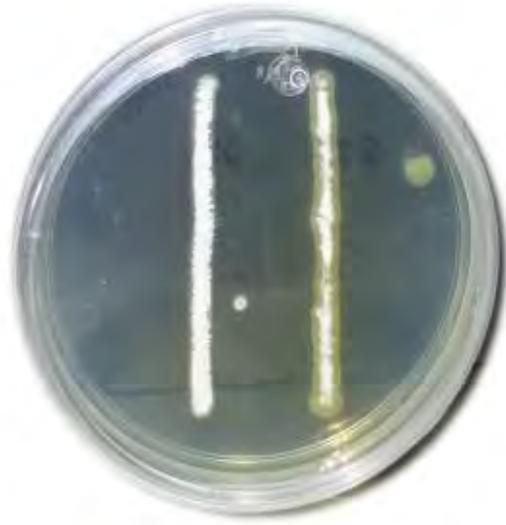
Figura 19: Ensayo de antagonismo entre la cepa NCA 145 y la cepa NCA 143.



Figura 20: Ensayo de antagonismo entre la cepa NCA 120 y la cepa NCA 126.



Siembra en cruz



Siembra en paralelo

Figura 21: Ensayo de antagonismo entre la cepa NCA 151 y la cepa NCA 160.



Siembra en cruz



Siembra en paralelo

Figura 22: Ensayo de antagonismo entre la cepa NCA 144 y la cepa NCA 140.



Figura 23: Ensayo de antagonismo entre la cepa NCA 137 y la cepa NCA 131.



Figura 24: Ensayo de antagonismo entre la cepa NCA 119 y la cepa NCA 131.

Tabla 3

Cepas que mostraron antagonismo en los ensayos de siembra cruzada y en paralelo.

Clave de la cepa dominante	Zona de muestreo	Clave de la cepa inhibida	Zona de muestreo	Tipo de inhibición
NCA 119	Afuera	NCA 131	Canal	Inhibición de crecimiento
NCA 137	Canal	NCA 131	Canal	Inhibición de esporulación
NCA 119	Afuera	NCA 112	Afuera	Inhibición de crecimiento
NCA 119	Afuera	NCA 137	Canal	Inhibición de crecimiento
NCA 183	Afuera	NCA 180	Afuera	Inhibición de esporulación
NCA 145	Canal	NCA 143	Canal	Inhibición de crecimiento
NCA 210	Raíz	NCA 220	raíz	Inhibición de esporulación
NCA 120	Afuera	NCA 126	Afuera	Inhibición de esporulación
NCA 144	Canal	NCA 140	Canal	Inhibición de crecimiento
NCA 208	Raíz	NCA 205	Raíz	Inhibición de crecimiento
NCA 173	Afuera	NCA 154	Afuera	Inhibición de esporulación
NCA 151	Raíz	NCA 160	Raíz	Inhibición de crecimiento

Para realizar las pruebas de antagonismo químico con los extractos orgánicos se eligieron las cepas indicadas en la **Tabla 4** y **Figura 25**, las cuales mostraron actividad antagónica en las pruebas antes descritas.

Tabla 4

Cepas dominantes seleccionadas para las pruebas de antagonismo químico con los extractos orgánicos

Zona de muestreo	Clave de la cepa	Tipo de inhibición
Afuera	NCA 119	Inhibición de esporulación
Afuera	NCA 120	Inhibición de esporulación
Canal	NCA 137	Inhibición de crecimiento
Canal	NCA 144	Inhibición de crecimiento
Canal	NCA 145	Inhibición de esporulación
Raíz	NCA 151	Inhibición de crecimiento

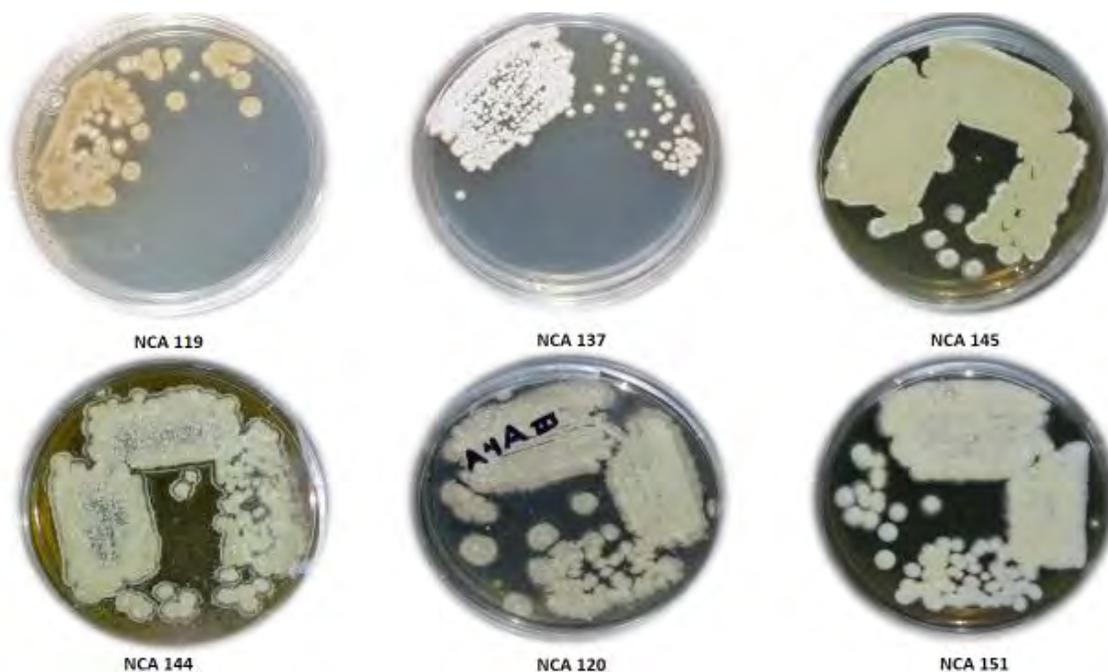


Figura 25: Cepas dominantes elegidas para las pruebas de antagonismo químico.

5.3 Extracción orgánica

Los extractos orgánicos de las cepas seleccionadas en las pruebas de antagonismo se obtuvieron siguiendo la metodología descrita en el inciso 4.5. Cabe mencionar que el disolvente AcOEt empleado para la obtención de los extractos, ha sido ampliamente descrito en la literatura (Jensen *et al.*, 2006; Mincer *et al.*, 2002). Además, en este proyecto también se obtuvieron y ensayaron los extractos de acetona y metanol (**Tabla 5**).

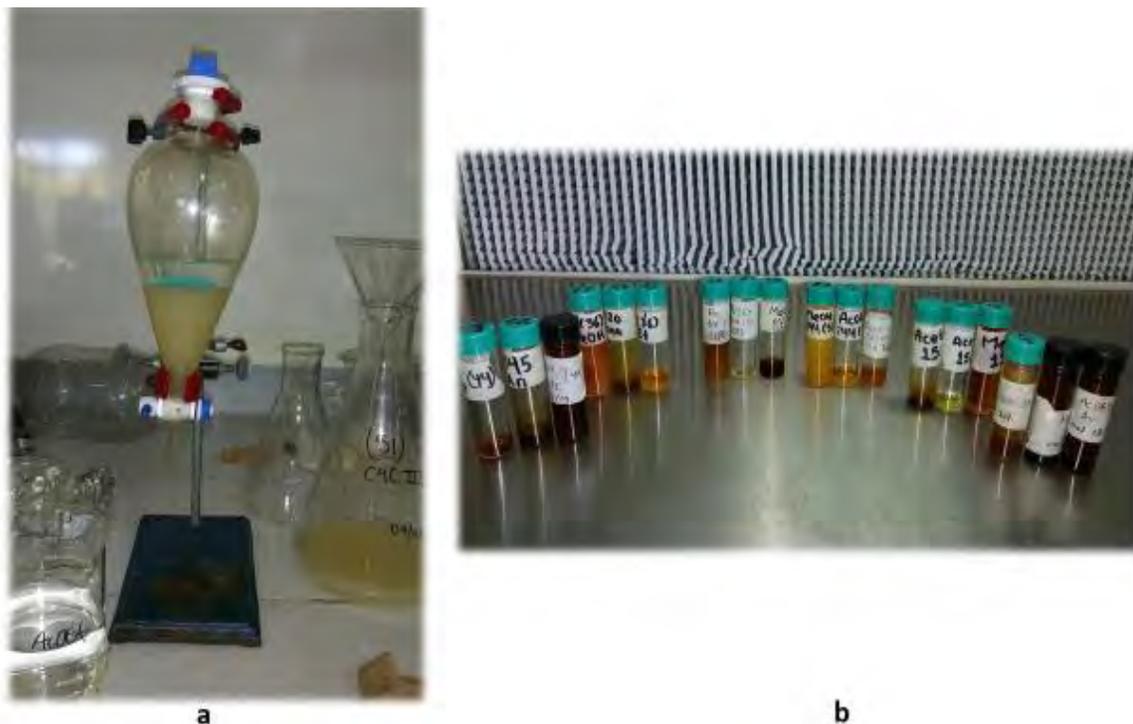


Figura 26: (a) Extracción por partición con AcOEt, (b) Extractos obtenidos de las cepas reactivadas.

Tabla 5

Rendimiento de los extractos orgánicos* de las cepas seleccionadas con base en los ensayos de antagonismo

Clave de cepa	Extracto AcOEt (mg)	Extracto acetona (mg)	Extracto MeOH (mg)
NCA 119	24.1	475.8	138.7
NCA 120	19.2	67.0	328.4
NCA 137	15.5	144.0	345.3
NCA 144	37.1	152.1	282.4
NCA 145	29.0	192.8	466.7
NCA 151	18.4	158.3	565.9

*Extractos obtenidos a partir de 1L de cultivo bacteriano.

5.4 Cromatografía en capa fina de los extractos orgánicos

Los extractos de AcOEt de las cepas que conservaron la actividad antagónica (**Tabla 4**), fueron sometidos a análisis cromatografico siguiendo la metodología descrita en el inciso **4.7**. Como se puede observar en la **Figura 27**, todos los extractos mostraron buena separación cromatográfica y se presentaron múltiples bandas en cada muestra que corresponden a distintos metabolitos secundarios.

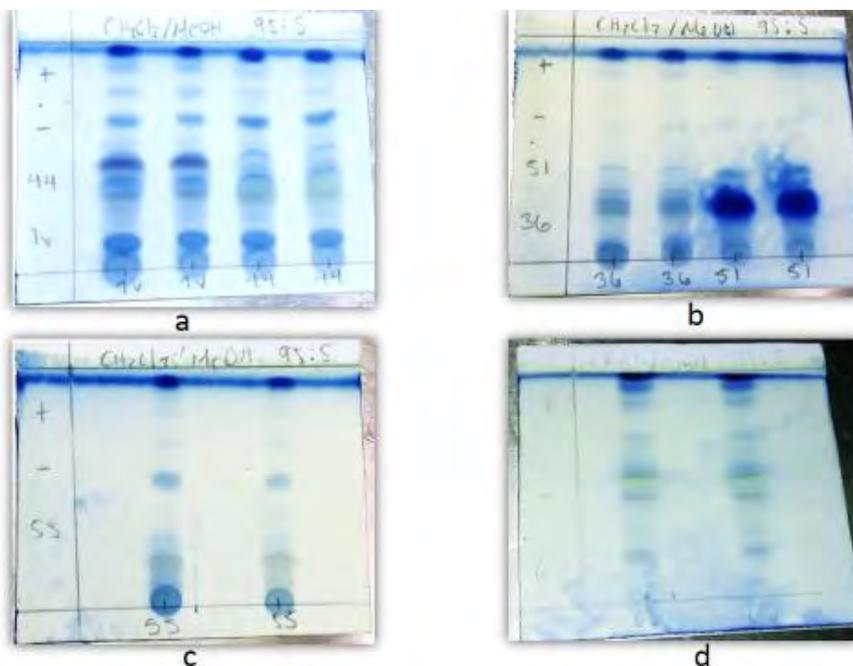


Figura 27: Cromatografía en capa fina de los extractos de AcOEt (a) NCA 137 (1v) y NCA 145 (44), (b) NCA 120 (36) y NCA 144 (51), (c) NCA 151, (d) NCA 119.

5.5 Prueba de difusión en disco

Se realizaron las pruebas de difusión en disco con los extractos orgánicos de AcOEt, acetona y MeOH obtenidos previamente (**Tabla 5**). En la **Figura 28** se ilustran los resultados para las cepas NCA 145 y NCA 151 en donde se puede observar una evidente inhibición de crecimiento de la cepa NCA 143 y NCA 160, respectivamente. Las cepas NCA 151 y NCA 144 mostraron el mismo comportamiento con los extractos de acetona.

Tabla 6

Resultados de los ensayos de antagonismo químico en la prueba de difusión en disco

Clave de la cepa dominante	Clave de la cepa inhibida	Extracto activo	Tipo de inhibición
NCA 119	NCA 131	AcOEt	Inhibición esporulación
NCA 144	NCA 140	Acetona	Inhibición de crecimiento
NCA 145	NCA 143	AcOEt	Inhibición de crecimiento
NCA 151	NCA 160	AcOEt	Inhibición de crecimiento
		Acetona	Inhibición de crecimiento



Figura 28: Cepas que mostraron antagonismo químico en las pruebas de difusión en disco: (a) Extractos de AcOEt, (b) Extractos de acetona, (c) Extractos de MeOH, (d) Agua estéril, (e) CH₂Cl₂-MeOH 1:1.

5.6 Bioautografía

En las **figuras 29** y **30** se muestran los resultados de los ensayos de bioautografía de los extractos de AcOEt de las cepas dominantes NCA 119, NCA 120, NCA 137, NCA 144, NCA 145 y NCA 151 contra los patógenos *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Los resultados globales de estas pruebas se ilustran en la **Tabla 7**.

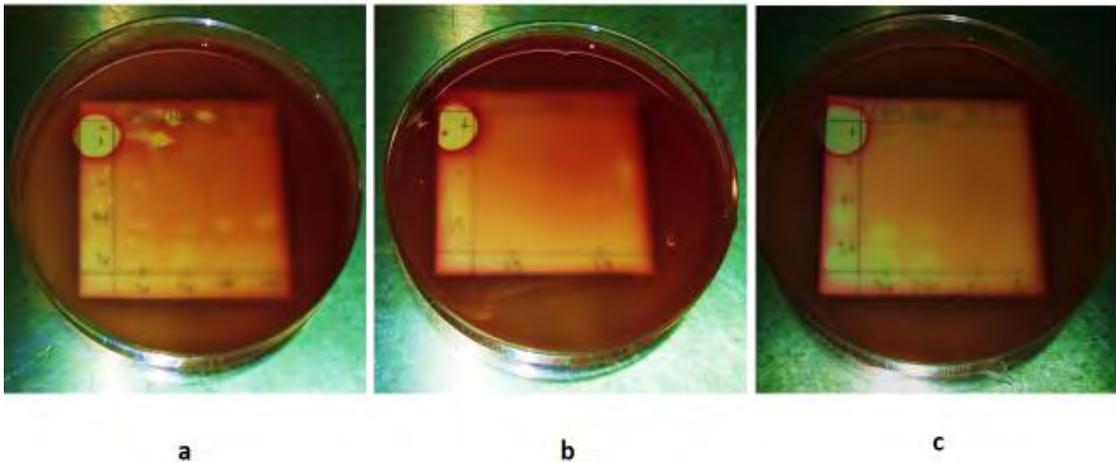


Figura 29: Actividad contra el patógeno *Pseudomonas aeruginosa* en el bioensayo con los extractos de AcOEt de a) NCA 137 (1v) y NCA 145 (44), (b) NCA 151 (55), (c) NCA 120 (36) y NCA 144 (51).

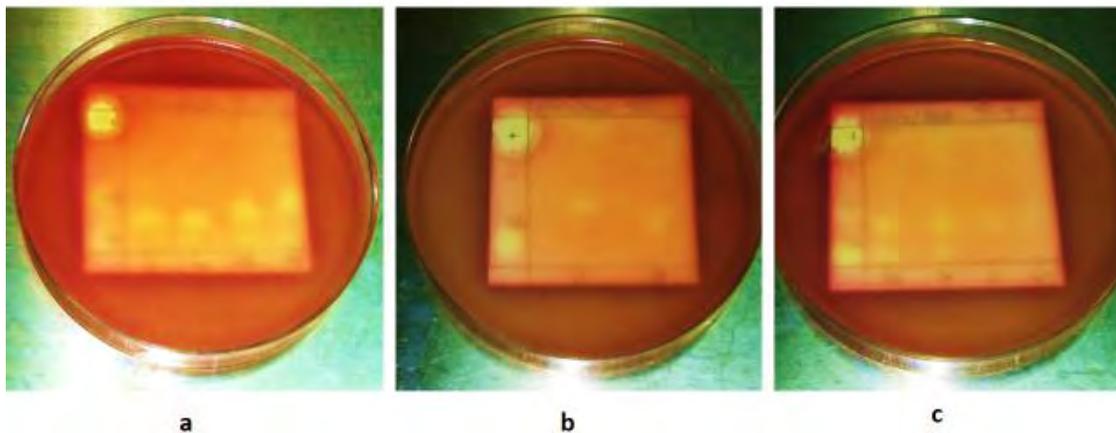


Figura 30: Actividad contra el patógeno de *Staphylococcus aureus* en el bioensayo con los extractos de AcOEt de a) NCA 137 (1v) y NCA 145 (44), (b) NCA 151 (55), (c) NCA 120 (36) y NCA 144 (51).

Tabla 7

Resultados de las pruebas de bioautografía

Cepa	Patógeno de prueba	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
NCA 120	+	+
NCA 137	+	+
NCA 144	-	+
NCA 145	+	+
NCA 151	-	+

5.7 Fraccionamiento primario en columna abierta

El extracto de acetona de la cepa NCA 151 se sometió a un fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice, siguiendo la metodología descrita en el inciso 4.8. Así, se obtuvieron un total de 22 fracciones de aproximadamente 3 mL cada una (**Figura 31**), y se analizaron las fracciones 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 y 22 (**Figura 32**), debido a que a partir de la fracción 8 se observaba una ligera coloración. En diferentes estudios previos se ha establecido una relación de la actividad antimicrobiana con la producción de pigmentos (Azamjon *et al.*, 2011).

La fracción 8, que eluyó aproximadamente a los 16 min, mostró actividad biológica contra ambos patógenos *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (**Figura 33 y 34**).

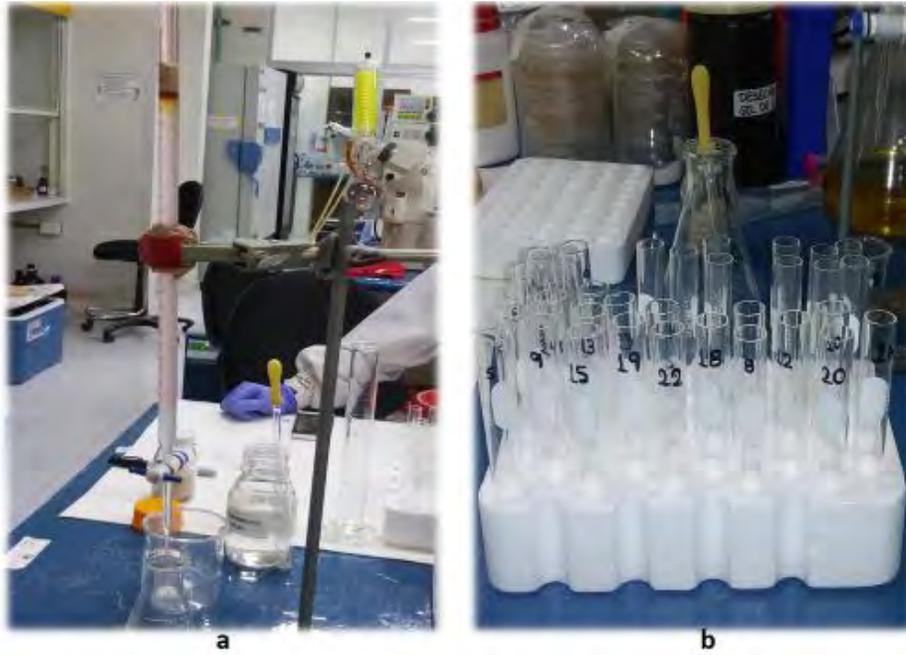


Figura 31: (a) Fraccionamiento en columna abierta, (b) Fracciones obtenidas.

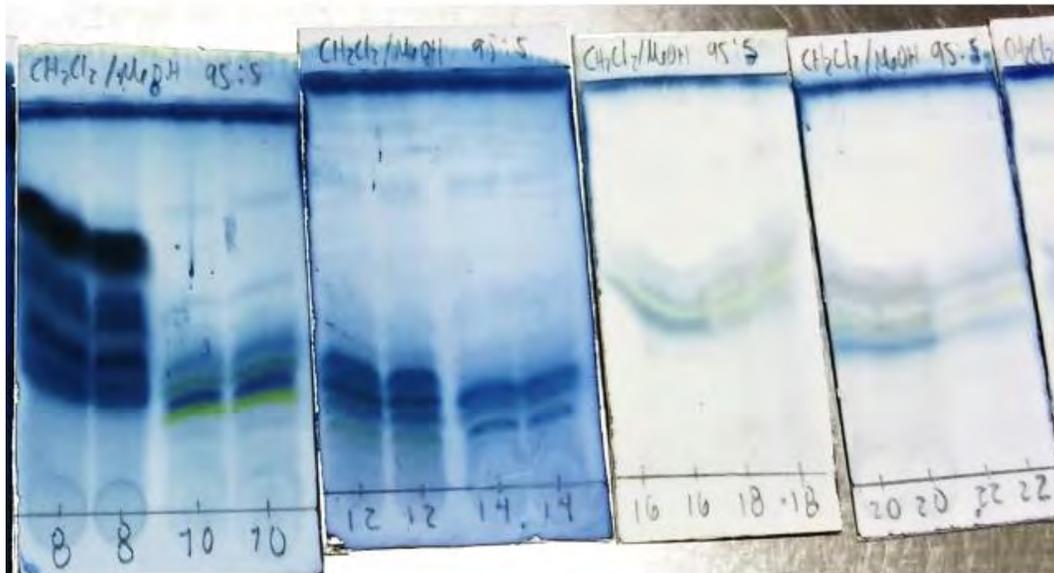


Figura 32: cromatografía en capa fina de las fracciones del extracto de acetona de la cepa NCA 151.

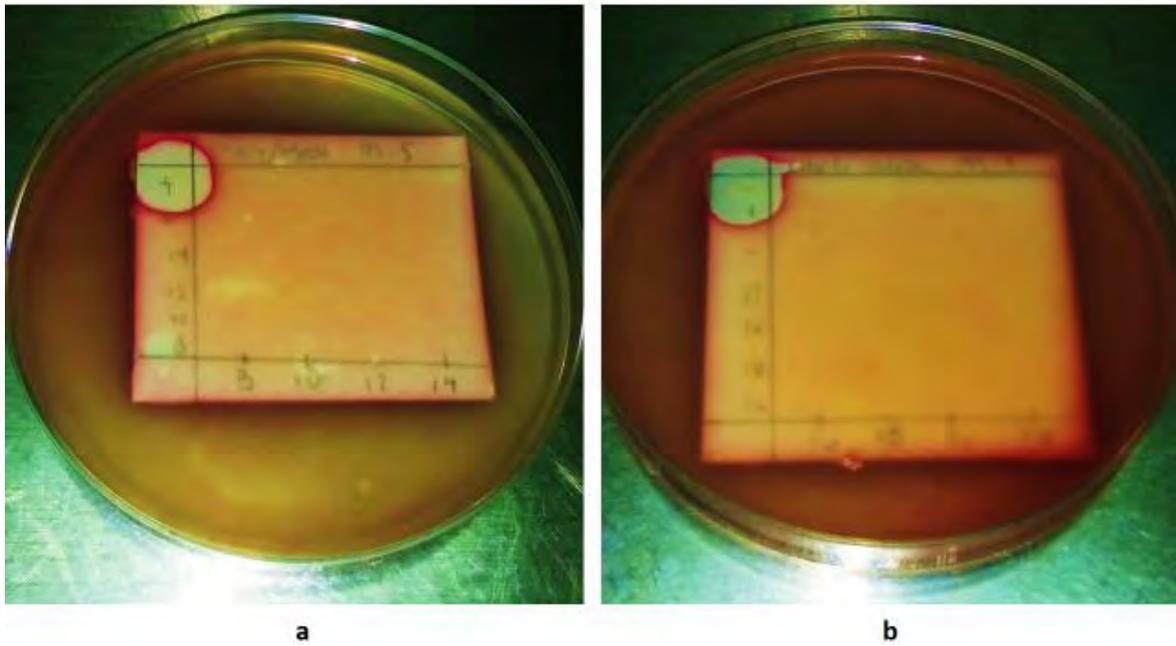


Figura 33: Actividad de las fracciones primarias del extracto de acetona de la cepa NCA 151 contra el patógeno *Pseudomonas aeruginosa*, (a) Fracciones 8-14, (b) Fracciones 16-22.

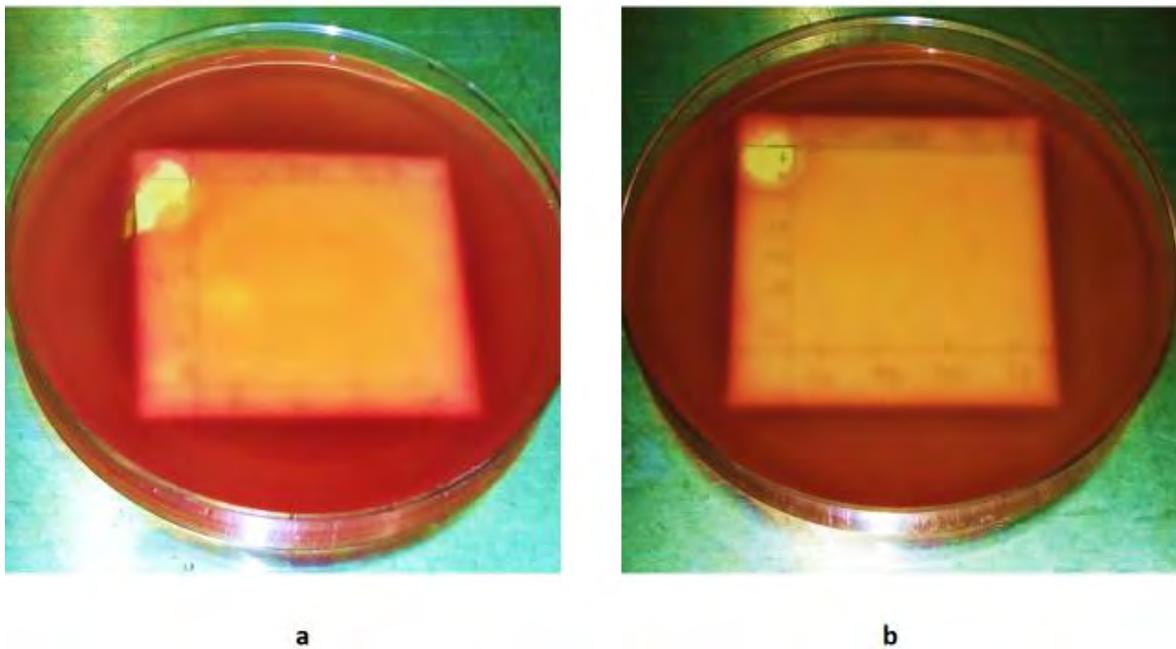


Figura 34: Actividad de las fracciones del extracto de acetona de la cepa NCA 151 contra el patógeno *Staphylococcus aureus*, (a) Fracciones 8-14, (b) Fracciones 16-22.

6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Existe gran interés en la comunidad científica por el estudio y la obtención de metabolitos secundarios a partir de bacterias para el desarrollo de nuevos fármacos. El principal grupo de bacterias responsable de la producción de compuestos con actividad biológica es el de las actinobacterias. A la fecha se han reportado aproximadamente 23 000 compuestos bioactivos producidos por microorganismos y más de 10 000 de ellos fueron aislados a partir de actinomicetos (Berdy, 2012). Numerosos estudios han demostrado la presencia de actinomicetos en sedimentos marinos y su capacidad para sintetizar productos naturales con actividad biológica (Mincer *et al.*, 2002; Jensen *et al.*, 2005; Prieto-Davó *et al.*, 2013).

El presente trabajo se planteó con la finalidad de explorar el potencial antimicrobiano de los extractos orgánicos de los microorganismos aislados de las comunidades de los sedimentos costeros de Sisal, Yucatán. Para ello, se diseñó una estrategia en la que se evaluaron las interacciones antagónicas entre las distintas cepas y sus extractos orgánicos.

Cabe mencionar que las bacterias utilizan defensas químicas para competir por el espacio y los nutrientes disponibles (Long y Azam, 2001). La producción de sustancias bioactivas que inhiben el crecimiento de otros organismos un fenómeno común entre bacterias aisladas de biopelículas bacterianas (Avendano-Herrera y Riquelme, 2007; Wietz *et al.*, 2013).

En este trabajo se aislaron 114 cepas con morfología típica de actinomicetos y pertenecientes al grupo Gram-positivo (prueba de KOH). Se observaron interacciones antagónicas en 12 cepas (10.5%), y los extractos orgánicos de cinco

organismos selectos fueron activos contra los patógenos *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

Estudios similares sobre interacciones antagónicas entre bacterias aisladas de distintos ambientes marinos han demostrado que entre el 5 y 8% de los organismos presentaron algún tipo de actividad (Krasilnokova, 1961; Nair y Simidu, 1987).

Cabe mencionar que la ecología microbiana de los sitios de muestreo está altamente influenciada por la naturaleza química del suelo, debido a ello, las poblaciones de actinomicetos aislados y su comportamiento cambian de acuerdo a la locación del muestreo (Mitra *et al.*, 2008). Por ejemplo, se ha reportado que los suelos que contienen una mayor cantidad de nitrógeno en comparación al carbono, son una mejor fuente de actinomicetos biológicamente activos (Holguin y Bashan, 2007). Así, estas características químicas de los suelos o sedimentos podrían ser factores determinantes en la actividad antimicrobiana de los actinomicetos (Mitra *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha observado que las bacterias provenientes de sedimentos marinos producen metabolitos secundarios que afectan la forma de interacción con otras bacterias y con las comunidades de macro- y microorganismos, con los que interactúan (Mitra *et al.*, 2008). En este sentido el estudio de diferentes suelos para entender el comportamiento de dichos actinomicetos es de gran relevancia.

El potencial antimicrobiano de las bacterias de sedimentos costeros de la Ciénega de Sisal, Yucatán, se pudo validar mediante el análisis de la actividad biológica de los extractos orgánicos de las cepas NCA 120, NCA 137, NCA 144, NCA 145 y NCA 151. En el caso de la cepa NCA 151, la actividad biológica se mantuvo contra el

patógeno *Pseudomonas aeruginosa* después del fraccionamiento primario del extracto orgánico. Para determinar si esta fracción contiene un solo componente activo o varios, se requieren de otros análisis como resonancia magnética nuclear o espectrometría de masas.

Finalmente los actinomicetos constituyen una parte esencial de las comunidades microbianas en los ecosistemas marinos, incluyendo los manglares. De estas valiosas comunidades microbianas se pueden obtener distintos productos naturales con actividad biológica y con estructuras novedosas (Dhamaraj, 2010).

El aislamiento de 5 cepas con actividad antimicrobiana demuestra que la Ciénaga de Sisal es un ambiente en el que las interacciones químicas entre bacterias es algo común y podría ser considerada una buena fuente para el descubrimiento de nuevos productos naturales. Así, las interacciones entre bacterias representan relaciones ecológicas importantes, además de que un inhibidor no es necesariamente un antibiótico, ya que, algunos inhibidores pueden estar involucrados en la comunicación bacteria-bacteria (quorum sensing) que regulan el metabolismo o la fisiología (Pesci *et al.*, 1999) y pueden alterar la composición de las especies de la comunidad bacteriana; así mismo, la inhibición también puede reflejar cambios en la disponibilidad de nutrientes (Wilcox *et al.*, 1991). En este estudio se comprobó la naturaleza química de la inhibición (antagonismo) ya que se mantuvo la actividad al extraer los compuestos.

En resumen, el estudio de actinomicetos provenientes de manglares mexicanos es novedoso y la producción de metabolitos secundarios por estos organismos es aún desconocida. Dichos actinomicetos requieren de una gran exploración como una valiosa fuente de productos naturales, ya que de ambientes similares, se han obtenido compuestos con estructuras únicas y de uso medicinal (Dong-Bo *et al.*, 2014).

REFERENCIAS

Amaral-Zettler, L., L. F. Artigas, J. Baross, P. A. L. Bharathi, A. Boetius, D. Chandramohan, G. Herndl, K. Kogure, P. Neal, C. Pedrós-Alió, A. Ramette, S. Schouten, L. Stal, A. Thessen, J. de Leeuw y M. Sogin. 2010. Oceans Present-Global Distributions, Part III. *Life in the World's Ocean: Diversity, Distributions and Abundance*, 223-245.

Amrita, K., J. Nitin y C. S. Devi. 2012. Novel bioactive compounds from Mangrove derived actinomycetes. *International Research Journal Pharmacy*, 3(9): 25-29.

Montaño-Arias, N. M., A. L. Sandoval-Pérez, S. L. Camargo-Ricalde y J. M. Sánchez-Yáñez. 2010. Los Microorganismos: pequeños gigantes. *Elementos*, 17(77): 15-23.

Avendaño-Herrera, R., M. Lody y C. E. Riquelme. 2005. Producción de sustancias inhibidoras entre bacterias de biopelículas en sustratos marinos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 40(2): 117-125.

Avendaño-Herrera, R. E. y C. E. Riquelme. 2007. Production of a diatom-bacteria biofilm in a photobioreactor for aquaculture applications. *Science direct*, 36 (2007): 97-104.

Azamjon, B. S., K. Hosokawa y E. Enomoto. 2011. Bioactive Pigments from Marine Bacteria: Applications and Physiological Roles. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011 (6703449):1-7.

Becerril-Espinosa, A., G. Guerra-Rivas, N. Ayala-Sánchez e I. E. Soria-Mercado. 2012. Antitumor activity of Actinobacteria isolated in marine sediment from Todos Santos Bay, Baja California, México. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 47(2): 317-325.

Berdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot*, 58: 1-26.

Berdy, J. 2012. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *The Journal of Antibiotics*, 65: 385-395.

Brenner, N., K. Farkash y E. Braun. 2006. Dynamics of protein distributions in cell populations. *Physical Biology*, 3: 172-182.

Buck, J. D. 1982. Nonstaining (KOH) Method for Determination of Gram Reactions of Marine Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(4): 992-993.

Bull, A. T., J. A. Asenjo. 2013. Microbiology of hyper-arid environments: recent insights from the Atacama Desert, Chile. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103: 1173-1179.

Bull, A. T. y J. E. M. Stach. 2007. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Trends in Microbiology*, 15(11): 491-499.

Bull, A. T., J. E. M. Stach, A. C. Ward y M. Goodfellow. 2005. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87(1): 65–79.

Calva B., L.G. y R. Torres–Alvarado. 2000. Distribución de carbohidratos, carbono y nitrógeno orgánico en sedimentos de tres lagunas costeras del Golfo de México. *Hidrobiológica*, 10(2).

Cammen, L. M. 1982. Effect of Particle Size on Organic Content and Microbial Abundance Within Four Marine Sediments. *Marine Ecology*, 9: 273–280.

Castillo, U., S. Myers, L. Browne, G. Strobel, W. M. Hess, J. Hanks y D. Reay. 2005. Scanning Electron Microscopy of Some Endophytic Streptomycetes in Snakevine–*Kennedia nigricans*. *Scanning*, 27(6): 305–311.

Chávez–Carabantes, N. 2016. Biogeografía de cepas de *Salinispora arenicola* evidenciada por el tipo de metabolitos secundarios que producen (Tesis de maestría), UNAM.

Colwell, F., R. Matsumoto y D. Reed. 2004. A review of the gas hydrates, geology and biology of the Nankai Trough. *Chemical Geology*, 205: 391–404.

Das, S., P. S. Lyla y S. A. Khan. 2006. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. *Current Science*, 90(10): 1325–1335.

Deepa, D., S. Achanta, J. Jaju, K. Rao, R. Samyukta, M. Claassens, A. M. V. Kumar, V. PH. 2013. The Impact of Isoniazid Resistance on the Treatment Outcomes of Smear Positive Re–Treatment Tuberculosis Patients in the State of Andhra Pradesh, India. *PLOS ONE*, 8(10): 1–6.

Doyle, L. J. y P. H. Feldhausen. 1981. Bottom Sediments of the Eastern Gulf of Mexico Examined with Traditional and Multivariate Statistical Methods. *Mathematical Geology*, 13 (2): 93–117.

Dhamaraj, S. 2010. Marine *Streptomyces* as a novel source of bioactive substances. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 26:2123–2139.

Dong–Bo, X., Y. Wan–Wan, H. Ying, D. Zi–Xin y H. Kui. 2014. Natural Products from Mangrove Actinomycetes. *Marine Drugs*, 12: 2590–2613.

Dong, L. Y. Tian–Ci, X. Yun y Z. Zhi–Qiang. 2013. Hotspots of new species discovery: new mite species described during 2007 to 2012. *A fourfing Journal of biotaxa*, 3363(1): 102.

Echeverría–García, A. W. 2003. Ficha Informativa de los Humedales de Ramsar. *Departamento de Áreas Naturales Protegidas de la Secretaría de Ecología del Estado de Yucatán, México*. 1–18.

Fenical, W., D. Baden, M. Burg, C.V. de Goyet, J. D. Grimes, M. Katz, N. H. Marcus, S. Pomponi, P. Rhines, P. Tester y J. Vena. 1999. Marine derived pharmaceuticals and related bioactive compounds. En *From Monsoons to Microbes: Understanding the Ocean's Role in Human Health*. 71–86.

Fenical, W. y P. R. Jensen. 2006. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nature Chemical Biology*, 2(12): 666–673.

Fredrickson, A. G. y Stephanopoulos, G. 1981. Microbial Competition. *Science*, 213(4511): 972-9.

Ghizelini, A. M., L. C. S. Mendonça–Hagler y A. Macrae. 2012. Microbial in Brazilian mangrove sediments– a mini review. *Braz. J. Microbiol.*, 43(4): 1242–1254.

Graizbord, B., J. Bello–Pineda, P. H. Rodríguez–Herrero y L. Gómez–Mendoza. 2004. Diagnóstico actual de la zona costera del Golfo de México. En: Textos de la Reserva Estatal Ciénegas y Manglares de la zona de Yucatán.

Goodfellow, M. y S. T. Williams. 1983. Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.*, 37: 189–216.

Gulve, R. M. y A. M. Deshmukh. 2011. Enzymatic Activity of Actinomycetes Isolated from Marine Sediments. *Recent Research in Science and Technology*, 3(5): 80–83.

Gulve, R. M. y A. M. Deshmukh. 2012. Antimicrobial activity of marine actinomycetes. *International Multidisciplinary Research Journal*, 2(3):16–22.

Hameş–Kocabaş, E. E. y A. Uzel. 2012. Isolation strategies of marine–derived actinomycetes from sponge and sediment samples. *Journal of Microbiological Methods*, 88: 342–347.

He, J., Zhang, D., Xu, Y., Zhan, X., Tang, S., Xu, L., Li, W. 2012. Diversity and bioactivities of culturable marine actinobacteria isolated from mangrove sediment in Indian Ocean. *Acta Microbiol. Sin.* 52: 1195–1202.

Holguin, G., P. Vazquez y Y. Bashan. 2001. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. *Biol Fertil Soils* 33: 265–278.

Holguin, G. y Y. Bashan. 2007. La importancia de los manglares y su microbiología para el sostenimiento de las pesqueras costeras. En: Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta–microorganismo. (Eds) Ferrera–Cerrato, R., y Alarcon, A. Capítulo 10, Editorial Trillas, 239–253.

Hong, K., Gao, A.H., Xie, Q. Y., Gao, H., Zhuang, L., Lin, H.P., Yu, H.P., Li, J., Yao, X.S., Goodfellow, M. 2009 Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Marine Drugs*, 7:24–44.

Hooper, D. U., F. S. Chapin, J. J. Ewel, A. Hector, P. Inchausti, S. Lavorel, J. H. Lawton, D. M. Lodge, M. Loreau, S. Naeem, B. Schmid, H. Setälä, A. J. Symstad, J.

- Vandermeer y D. A. Wardle. 2005. Effects of Biodiversity on Ecosystem Functioning: A Consensus of Current Knowledge. *Ecological Monographs*, 75(1): 3–35.
- Hughes, C. C., A. Prieto-Davó, P. R. Jensen y W. Fenical. 2008. The Marinopyrroles, Antibiotics of an Unprecedented Structure Class from a Marine *Streptomyces* sp. *American Chemical Society*, 10(4): 629–631.
- Hunter-Cevera, J. C. 1998. The value of microbial diversity. *Current Opinion in Microbiology*, 1:278285.
- Imada, C., N. Koseki, M. Kamata, T. Kobayashi y N. Hamada-Sato. 2007. Isolation and characterization of actinobacterial substances produced by marine actinomycetes in the presence of seawater. *Actinomycetologica*, 21:27–31.
- Imada, C., S. Masuda, T. Kobayashi, N. Hamada-Sato y T. Nakashima. 2010. Isolation and Characterization of Marine and Terrestrial Actinomycetes Using a Medium Supplemented with NaCl. *Actinomycetologica*, 24:12–17.
- Inagaki, F., M. Suzuki, K. Takai, H. Oida, T. Sakamoto, K. Aoki, K. H. Nealson y K. Horikoshi. 2003. Microbial Communities Associated with Geological Horizons in Coastal Subseafloor Sediments from the Sea of Okhotsk. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12): 7224–7235.
- Jensen, P. R. y W. Fenical. 1996. Marine bacterial diversity as a resource for novel microbial products. *Journal of Industrial Microbiology*, 17: 346–351.
- Jensen, P. R., E. Gontang, C. Mafnas, T. J. Mincer y W. Fenical. 2005. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environmental Microbiology*, 7(7): 1039–1048.
- Karigar, C. S., S. S. Rao. 2011. Role of microbial enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review. *Enzyme Research*, 2011: 1–11.
- Kathiresan, K. y B. L. Bingham. 2001. Boilogy of Mangroves and Mangrove Ecosystems. *Advances in marine biology*, 40: 81–251.
- Kim B.S., H. M. Oh, H. Kang, S.S. Park y J. Chun. 2004. Remarkable Bacterial Diversity in the Tidal Flat Sediment as Revealed by 16S Rdna Analysis. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(1): 205–211.
- Kin, S. L. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Science direct*, 9: 245–251.
- Kördel, W., M. Dassenakis, J. Lintelmann y S. Padberg. 1997. The importance of natural organic material for environmental processes in waters and soils. *Pure and Appl. Chem.*, 69(7): 1571–1600.
- Kwon, H. C., C. A. Kauffman, P. R. Jensen y W. Fenical. 2006. Marinomycins A–D, Antitumor–Antibiotics of a New Structure Class from a Marine Actinomycete of the

- Recently Discovered Genus "*Marinispora*". *Journal of the American Chemical Society*, 128(5): 1622–1632.
- Lara–González, W. M. 2016. Estudio de aislados marinos del género *Micromonospora* con la capacidad de producir micelio aéreo (Tesis de maestría). UNAM.
- Lanoil, B. D., R. Sassen, M. T. La Duc, S. T. Sweet y K. H. Nealson. 2001. Bacteria and Archaea Physically Associated with Gulf of Mexico Gas Hydrates. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11): 5143–5153.
- León, J., J. J. Aponte, R. Rojas, D. Cuadra, N. Ayala, G. Tomás y M. Guerrero. 2011. Estudio de actinomicetos marinos aislados de la costa central del Perú y su actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes y *Enterococcus faecalis* vancomicina resistentes. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública*, 28(2): 237–246.
- Liu, J. T., X. L. Lu, X. Y. Liu, Y. Gao, B. Hu, B. H. Jiao y H. Zheng. 2013. Bioactive natural products from the antarctic and arctic organisms. *Med. Chem.* 13: 617–626.
- Long, R. A. y F. Azam. 2001. Antagonistic Interactions among Marine Pelagic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11): 4975–4983.
- Machado–Dias, T. L. C. 2013. Estudo da biodiversidade em actinobactérias marinhas, provenientes de sedimentos oceánicos colhidos no Arquipélago da Madeira. Tesis Mtr. en Biotecnología.
- Madigan, M. T. 2003 Anoxygenic phototropic bacteria from extreme environments. *Photosynthesis Research*, 76(1–3): 157–171.
- Madrid, V.M., J. Y. Aller, R. C. Aller y A. Y. Chistoserdov. 2001. High prokaryote diversity and analysis of community structure in mobile and deposits off French Guiana: identification of two new bacterial candidate divisions. *Microbiology Ecology*, 37: 197–209.
- Magarvey, N. A., J. M. Keller, V. Berman, M. Dworkin y D. H. Sherman. 2004. Isolation and Characterization of Novel Marine–Derived Actinomycete Taxa Rich Bioactive Metabolites. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 7520–7529.
- Maldonado, L. A., J. E. M. Stach, W. Pathom–aree, A. C. Ward, A. T. Bull y M. Goodfellow. 2005a. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87: 11–18.
- Maldonado, L. A., W. Fenical, P. R. Jensen, C. A. Kauffman, T. J. Mincer, A. C. Ward, A. T. Bull y M. Goodfellow. 2005b. *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55: 1759–1766.

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

Manivasagan, P., J. Venkatesan, K. Sivakumar y S. Kim. 2013. Marine actinobacterial metabolites: Current status and future perspectives. *Microbial Research*, 168: 311–332.

Mincer, T. J., P. R. Jensen, C. A. Kuffman y W. Fenical. 2002. Widespread and Persistent Populations of a Major New Marine Actinomycete Taxon in Ocean Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10): 5005–5011.

Mincer, T. J., W. Fenical y P. R. Jensen. 2005. Culture-Dependent and Culture-Independent Diversity within Obligate Marine Actinomycete Genus *Salinispora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11): 7019–7028.

Mitra, A., S. C. Santra y J. Mukherjee. 2008. Distribution of actinomycetes, their antagonistic behavior and the physico-chemical characteristics of the world's largest tidal mangrove forest. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(4): 685–695.

Morán, M. A., L. T. Rutherford y R. E. Hodson. 1995. Evidence for Indigenous *Streptomyces* Populations in a Marine Environment Determined with a 16S rRNA Probe. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(10):3695–3700.

Nealson, K. H. 1997. Sediment Bacteria: Who's There, What Are They Doing, and What's New? *Earth Planet. Sci* 25: 403–34.

Ortiz, E., L. Coya, L. González, L. Graña, G. Pérez y S. Sánchez. 2004. Detección de actividades biológicas en microorganismos marinos aislados de la plataforma cubana. *Revista Avicennia*, 17: 123–130.

Parera-Valadez, Y. 2015. Aislamiento e identificación de actinomicetos asociados a sedimentos marinos de la Península de Yucatán (Tesis de maestría). UNAM.

Pesci, E. C., J. B. Milbank, J. P. Pearson, S. McKnight, A. S. Kende, E. P. Greenberg y B. H. Iglewski. 1999. Quinoline signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96(20): 11229–11234.

Prieto-Davó, A., P. R. Jensen y W. Fenical. 2008. Comparative actinomycete diversity in marine sediments. *Aquatic Microbial Ecology*, 52:1–11.

Prieto-Davó, A., L. J. Villareal-Gómez, S. Forschner-Dancause, A. T. Bull, J. E. M. Stach, D. C. Smith, D. C. Rowely y P. R. Jensen. 2013. Targeted search for actinomycetes from nearshore and deep-sea marine sediments. *FEMS Microbial Ecology*, 84(3): 510–518.

Reed, D.W., Y. Fujita, M. E. Delwiche, D. B. Blackwelder, P.P. Sheridan, T. Uchida y F. S. Colwell. 2002. Microbial Communities from Methane Hydrate-Bearing Deep

- Marine Sediments in a Forearc Basin. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8): 3759–3770.
- Rioja–Nieto, R., J. A. Moreno–Ruíz y J. Gómez–Valdés. 2015. Efecto del manejo de un Área Natural Protegida en el paisaje del bosque de manglar de la Península de Yucatán. *Hidrobiológica*, 25(2): 203–211.
- Rothschild, L. J. y R. L. Mancinelli. 2001. Life in extreme environments. *Nature*, 49(6823):1092–101.
- Rublee, P. y B. E. Dornseif. 1978. Direct Counts of Bacteria in the Sediments of a North Carolina Salt Marsh. Department of Zoology, North Carolina State University, Raleigh Short Papers and Notes, Vol. 1, No. 3: 188–191.
- Russell, T. H. 2004 Microbes from Marine Sponges: A treasure Trove of Biodiversity for Natural Products Discovery. *Microbial Diversity and Bioprospecting*.
- Sogin M. L., H. G. Morrison, J. A. Huber, D. M. Welch, S. M. Huse, P. R. Neal, J. M. Arrieta y G. J. Herndl. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(32): 12115–12120.
- Solanki, R. y M. Khanna. 2008. Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian Journal Microbiology*, 48: 410–431.
- Stackebrandt, E., F. A. Rainey y N. L. Ward–Rainey. 1997. Proposal for a New Hierarchic Classification System, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(2): 479–491.
- Subramani, R., M. Jayaprakashvel y N. Mathivanan. 2006. Microbial status in seawater and costal sediments during pre– and post–tsunami periods in the Bay of Bengal, India. *Marine Ecology*, 27 (2006): 198–203.
- Subramani, R., y N. Mathivanan. 2009. Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. *World J Microbiol Biotechnol*, 25: 2103–2111.
- Subramani, R., W. Aalbersberg. 2012. Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metbolites. *Microbiological Research*, 167: 571–580.
- Surajit, D., P.S. Lyla y S. Khan. 2006. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. *Current Science*, 90(10): 1325–1335.
- Tarback, E. J. y F. K. Lutgens. 2005. Ciencias de la Tierra, una introduccion a la geofísica. Prentice Hall, Octava edición.
- Teske, A. 2013. Marine deep sediment microbial communities. *The Prokaryotes: Prokaryotic Communities and Ecophysiology*, 9783642301230: 123-138.

Thornnurg, C.C., T. M. Zabriskie, K. L. McPhail. 2010. Deep–Sea Hydrothermal Vents: Potencial Hot Spots for Natural Products Discovery? *Journal of Natural Products*, 73(3): 489–499.

Tiwari, K. y R. K. Gupta. 2012. Rare actinomycetes: a potencial storehouse for novel antibiotics. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(2): 108–132.

Tolozá–Moreno, D. L. 2014. Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas con el potencial antagonístico para el control biológico de *Fusarium oxysporum* (Schlecht) en cultivos de Uchuva (*Physalis peruviana* L.) en Ciénega, Boyacá (Colombia). *Universidad Nacional de Colombia*.

Torres–Beltrán, M., F. Cardoso–Martínez, N. Millán–Aguñaga, A. Becerril–Espinosa e I. E. Soria–Mercado. 2012. Evaluación of the Gulf of California as a potencial source of bioactive marine actinobacteria. *Ciencias Marinas*, 38(4): 609–624.

Usha, R., Mala, K.K., Venil, C.K., Palaniswamy, M. 2011. Screening of actinomycetes from mangrove ecosystem for L–asparaginase activity and optimization by response surface methodology. *Pol. Soc. Microbiol*, 60:1195–1202.

Venter, J. C., K. Remington, J. F. Heidelberg, A. L. Halpern, D. Rush, J. A. Eisen, D. Wu, I. Paulsen, K. E. Nelson, W. Nelson, D. E. Fouts, S. Levy, A. H. Knap, M. W. Lomas, K. Nealson, O. White, J. Peterson, J. Hoffman, R. Parsons, H. Baden–Tillson, C. Pfannkoch, Y. Rogers y H. O. Smith. 2004. Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304(66): 66–74.

Weyland, H. 1969. Actinomycetes in North Sea and Atlantic Ocean Sediments. *Nature*, 223: 1969.

Wietz, M., K. Duncan, N. V. Patin y P. R. Jensen. 2013. Antagonistic Interactions Mediated by Marine Bacteria: The Role of Small Molecules. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7): 879–891.

Wilcox, M. H., R. G. Finch, D. G. E. Smith, P. Williams y S. P. Denyer. 1991. Effects of carbón dioxide and sub–lethal levels of antibiotics on adherence of coagulase–negativestaphylococci to polystyrene and silicone rubber. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 27(5): 577–587.

Zaldívar–Jiménez, A., J. Herrera–Silveira, C. Coronado–Molina y D. Alonzo–Parra. 2004. Estructura y productividad de los manglares en la reserva de biosfera Ría Celestún, Yucatán, México. *Madera y Bosques*, (2): 25–35.

Zhang, H., W. Zhang, Y. Jin, M. Jin y X. Yu. 2008. A comparative study on the phylogenetic diversity of culturable actinobacteria isolated from five marine sponge species. *Antonie van Leeuwenhoek*, 93: 241–248.

Zhang, W., Z. Liu, S. Li, T. Yang, Q. Zhang, L. Ma, X. Tian, H. Zhang, C. Huang, S. Zhang, J. Ju, Y. Shen y C. Zhang. 2012. Spiroindimicins A–D: New Bisindole

Alkaloids from Deep-Sea-Derived Actinomycete. *Organic Letters*, 14(13): 3364-3367.