



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIOS COMPARATIVOS DE MIEMBROS DEL
GÉNERO *STREPTOMYCES* AISLADOS DE
SEDIMENTOS MARINOS DEL GOLFO DE
CALIFORNIA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

JUDITH MIRIAM HORTENSIA ROSELLÓN DRUKER

TUTOR DE TESIS:

DR. LUIS ÁNGEL MALDONADO MANJARREZ
ICML, UNAM



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

2008



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.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación se llevó a cabo gracias al apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT proyecto CO1-46894). Agradezco también al ICMYL por el apoyo brindado y a los organizadores, profesores y compañeros del Taller de Ecología y Paleoecología Marina. En especial quisiera agradecer a Yemin, Adriana y Bárbara por la ayuda proporcionada para realizar el mapa de localización de estaciones y muestras. También quiero agradecer al Dr. David Uriel (Laboratorio de Fitoplancton) y a Claudio (Laboratorio de Limnología) por el apoyo brindado con las instalaciones y equipos. Un agradecimiento especial a mis compañeras de laboratorio Adriana, Alondra y Dulce, que me apoyaron en todo el proceso de tesis.

Por último un gran agradecimiento a mis 4 sinodales de tesis, los cuales se tomaron el tiempo y tuvieron la paciencia y dedicación de revisar mi trabajo escrito de tesis: Dra. Erika Quintana Cano, Dr. Raúl Gío Argaez, Dr. Adolfo Gracia Gasca y M en C. Mario Alejandro Gómez Ponce. Y por supuesto doy las gracias al Dr. Luis Ángel Maldonado Manjarrez por los conocimientos, las habilidades y la paciencia que me proporcionó desde el primer día que lo conocí.

DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada con todo mi cariño y afecto a las siguientes personas que han hecho posible que yo haya llegado a ser la persona que soy ahora y las cuales me han brindado todo su amor y amistad:

A mis padres, los cuales siempre me inculcaron que la mejor herencia en la vida es la educación. Gracias papás por apoyarme durante todos estos años en mi camino de aprendizaje.

A mis Bobes queridas, Hortensia y Aída, a las cuales adoro con toda mi alma. Gracias por los consejos y la experiencia que sólo una bobe puede dar.

A mi abuelo, Sergio, que ha sido para mí un sostén de experiencia y ayuda. Gracias abuelo por estar allí siempre que te he necesitado.

A mi tío Juan, por ser mi inspiración y mi modelo a seguir en la vida.

A Toño, Paty, Pimpi, Toñito, Michelle, Santiago e Inés por enseñarme que no hay nada más importante que la familia.

A mi hermana Fanny.

A todos mis tíos, primos y sobrinos.

A todos mis amigos de la Factoría Escénica, con los cuales he pasado los momentos más divertidos de toda mi vida. En especial dedico este trabajo a Marco, Trixa, Ivonne, Victor, Graciela, Paulina, José Luis, Alejandro, Israel, Anabelle y Jorge.

A Aliza, por ser la mejor amiga y por estar allí en los momentos buenos y malos, felices y tristes.

A Goldie, Elvira, Ilana y Beny por haber mantenido esta amistad durante todos estos años.

A Priscila, Sonia y Selene por que 17 años de amistad son un tesoro enorme. Sé que a pesar del tiempo siempre estaremos juntas.

A Ale, Lupita, Eli, Mariana y Odeth por ser mis amigas x-philas, por los momentos tan divertidos que hemos pasado juntas y por que sé que siempre serán como mis hermanas.

A Majo, Regina, Bety, Gaby, Prisma, Elizabeth, Mauricio y Alejandro, mis amigos de la carrera.

A Luis Ángel Maldonado por ser no sólo mi asesor y maestro por casi 3 años sino por ser una fuente de aprendizaje constante. Gracias por la paciencia, los regaños, las felicitaciones y los conocimientos.

A mi querido Profe Gío, al cual tengo que agradecerle principalmente haberme permitido encontrar lo que más me gusta en la Biología y por ser además uno de los mejores profesores que he tenido y una persona en la cual sé que siempre tendré un apoyo.

A Fernando Sánchez, Luis Zambrano, Enrique Cantoral, Zenón Cano, Álvaro Chaos, Ricardo Torres (q.e.p.d) y Bernabé Rico por ser profesores que hicieron una diferencia en mi vida.

ÍNDICE

RESUMEN.....	8
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 Importancia biotecnológica y diversidad microbiana del mar.....	9
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES.....	15
2.1 Microbiología acuática y/o marina.....	15
2.2 El género <i>Streptomyces</i>	20
2.3 Aislamiento selectivo de miembros del género <i>Streptomyces</i>	30
2.4 Planteamiento del problema.....	35
2.5 Objetivo general.....	36
2.6 Objetivos particulares.....	36
2.7 Hipótesis.....	36
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
3.1 Campaña oceanográfica y sitio de estudio.....	38
3.2 Toma de muestras.....	39
3.3 Estudio molecular.....	40
3.3.1 Extracción de DNA de los sedimentos.....	40
3.3.2 PCR con primers universales 16S rRNA.....	43
3.3.2.1 Preparación del gel del agarosa.....	43
3.3.3 PCR con primers específicos para <i>Streptomyces</i>	46
3.4 Estudio molecular.....	46
3.4.1 Aislamiento selectivo.....	46
3.4.2 Purificación de los aislados.....	49
3.4.3 Extracción de DNA.....	50
3.4.4 PCR con primers universales.....	51
3.4.5 Secuenciamiento.....	51
3.4.6 Árboles filogenéticos.....	52
CAPÍTULO 4. RESULTADOS.....	53

4.1 Estudio molecular.....	53
4.2 Estudio microbiológico.....	54
CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN.....	61
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES.....	66
APÉNDICE.....	67
BIBLIOGRAFÍA.....	67

RESUMEN

Pocos estudios se han realizado acerca de la diversidad microbiana de bacterias Gram positivas en sedimentos marinos pero en base a estimados moleculares se ha establecido que la riqueza de este tipo de microorganismos y en particular miembros de la clase *Actinobacteria* en este hábitat es inmensa. Aunque por mucho tiempo se pensó que los microorganismos marinos provenían del arrastre desde el ambiente terrestre al marino, el descubrimiento de especies autóctonas de este ecosistema cambió drásticamente esa visión. En el presente trabajo se aislaron 20 microorganismos de la clase *Actinobacteria* (bacterias Gram positivas de alto contenido de Guanina-Citosina) a partir de muestras recolectadas en el Golfo de California (Mar de Cortés) aproximadamente a 300 metros de profundidad durante la campaña DIPAL-I (Febrero 2006). Los 20 aislados presentaron las características típicas de miembros del género *Streptomyces*, esto es, una pared celular tipo I caracterizada por la presencia de ácido diaminopimérico (*LL-A₂pm*) en la pared celular y cadenas de esporas en espiral. Adicionalmente, ocho de los veinte aislados se caracterizaron por un mejor crecimiento en medios de cultivo que contenían agua marina en su formulación. Sin embargo, los aislados no son dependientes de la presencia de agua marina como otros actinomicetos marinos (i.e. el género *Salinispora*) donde la presencia de agua marina es esencial para su crecimiento. Estudios filogenéticos indican que estos microorganismos representan nuevos núcleos taxonómicos al ser comparados con aquellas secuencias de especies válidamente descritas del género *Streptomyces*.

Palabras clave: *Actinobacteria*, actinomicetos, estudios filogenéticos, gen 16S rRNA, *Streptomyces*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia biológica y biotecnológica de la diversidad microbiana del mar

Aún sin saberlo, desde tiempos prehistóricos, el ser humano ya empleaba a los microorganismos en la modificación de sus alimentos (Zapata, 2004). Es gracias al proceso conocido como la fermentación que los microorganismos nos ofrecen entre otros muchos productos, antibióticos, cerveza, licores, pan, queso, vinagre y vino (Demain, 2000). Pero el cuidado y perfeccionamiento científico de algunos procesos ha dado como resultado productos tan sofisticados tanto para la alimentación humana como para combatir a las enfermedades ya conocidas o las emergentes.

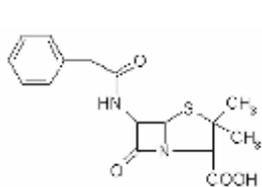
Los microorganismos producen una enorme cantidad de metabolitos primarios y secundarios que son compuestos que se obtienen a partir del metabolismo celular. Los metabolitos primarios (moléculas pequeñas producidas por todas las células vivas) más importantes para la industria son los ácidos orgánicos, aminoácidos, nucleótidos, solventes y vitaminas. Los metabolitos secundarios (moléculas producidas generalmente después del crecimiento bacteriano) son muy importantes, principalmente en el área farmacéutica. En ésta categoría se encuentran los antibióticos, antihelmínticos, antitumorales, biopesticidas, inhibidores enzimáticos, inmunosupresores y varios otros. En general, el mercado de antibióticos en EE.UU, se valúa en 30 millones de dólares e incluye aproximadamente 160 compuestos y derivados de origen bacteriano (Demain, 2000).

La biotecnología (definida como el uso de algunos organismos para hacer alguna tarea específica) es una ciencia que se basa en el descubrimiento y explotación de productos de origen biológico y que culmina con el desarrollo de productos comerciales de utilidad para el ser humano (Bull *et al.*, 2000). Esta ciencia nos permite descubrir, obtener y procesar los compuestos que algunos microorganismos producen naturalmente, los cuales tienen una importancia industrial muy relevante (Demian, 2000). En la búsqueda por antibióticos efectivos, muchos de los nuevos productos se obtienen químicamente (por

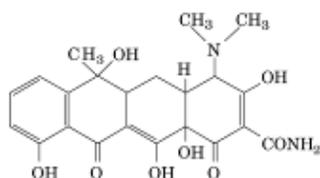
síntesis orgánica). Sin embargo, de aquellos antibióticos naturales de origen microbiano que presentan potencial industrial se realizan reacciones y modificaciones químicas (proceso que se conoce como semisíntesis) muchas veces sin éxito. En 1974, había más de 20,000 penicilinas semisintéticas, 4,000 cefalosporinas, 2,500 tetraciclinas, 1,000 rifamicinas, 500 kanamicinas y 500 cloramfenicoles, todos de origen microbiano (Cuadro 1; Demain, 2000; Goth, 1976).

Por lo anterior, es que el conocimiento de la diversidad microbiana para poder explotar al máximo los recursos microbianos, es importante tanto para proyectos de investigación como para los tecnológicos. Pero ¿Qué es la biodiversidad?. Para hablar de diversidad biológica y/o biodiversidad, es necesario primero entender la diferencia que existe entre este término y la riqueza específica, es decir, el número de especies presentes en una unidad geográfica definida (Begon *et al.*, 2006). La biodiversidad podría de alguna forma definirse igual que la riqueza específica, sin embargo, existe una diferencia la cual radica en que ésta puede ser vista en escalas más pequeñas o más grandes que las especies. Por ejemplo, podemos incluir la diversidad genética dentro de las especies reconociendo el valor de conservar distintas subpoblaciones y subespecies distintamente genéticas. A una escala mayor podemos incluir en la biodiversidad la variedad de tipos de comunidades presentes en una región (Begon *et al.*, 2006).

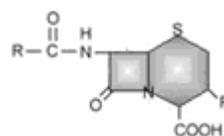
El mundo microbiano comprende a las bacterias, las arqueas, los hongos y los virus. Dentro de estos grupos, se conoce que las bacterias están distribuidas en todo el planeta (Hunter-Cevera, 1998). Por muchos años se consideró que la tierra y el agua dulce eran el mayor reservorio de microorganismos. Sin embargo, hace aproximadamente cuarenta años (1960's) que los investigadores comenzaron a ver los océanos como una nueva y virgen fuente de estudio debido a que representan el 95% del total de nuestro planeta y lo que se traduce en un potencial único para el descubrimiento y extracción de compuestos microbianos. Año con año desde la década pasada, los microorganismos marinos han recibido una atención cada vez más grande. La investigación de microorganismos marinos como una fuente de compuestos y productos de alta importancia económica, continua siendo una prometedora área de estudio (Davidson, 1995).



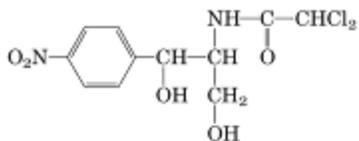
Penicilina G



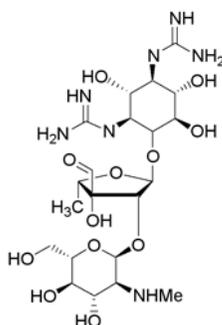
Tetraciclina



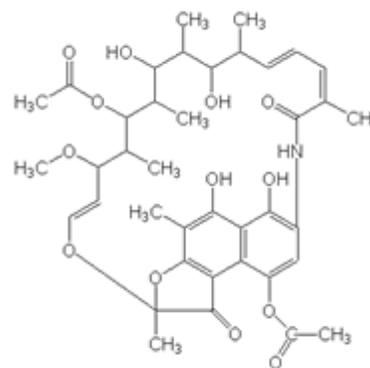
Cefalosporina



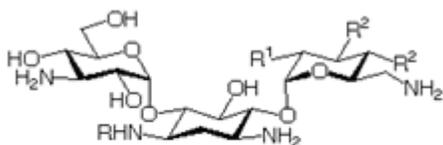
Cloranfenicol



Estreptomina



Rifamicina B



R ¹	R ²	R	Kenamicina
OH	OH	H	

Cuadro 1. Estructuras químicas de algunos antibióticos producidos por microorganismos.
Fuente: Demain, 2000; Goth, 1976 y Tolba *et al.*, 2002

En este contexto, es importante mencionar que en 1975, México amplió su superficie marina al establecerse en la Constitución las 200 millas náuticas (370.4 Km) como Zona Económica Exclusiva. Lo anterior dio como resultado que la porción marina

resultara ser más grande que la terrestre (Figura 1) y resulta entonces evidente la gran cantidad de investigación que nuestros océanos y mares pueden ofrecer. Desafortunadamente, México cuenta con un reducido personal científico especializado para el estudio de los microorganismos marinos, el cual pueda estudiar y determinar de una manera real todo lo que los océanos y mares mexicanos seguramente contienen. Algunos de los centros e institutos donde actualmente se desarrolla investigación marina en México se muestran en la tabla 1. Se necesita formar y desarrollar la capacidad científica para explotar, explorar, administrar e incluso negociar entre países los recursos naturales, de manera que generen y desencadenen realmente un desarrollo socioeconómico (Gio, 1999).

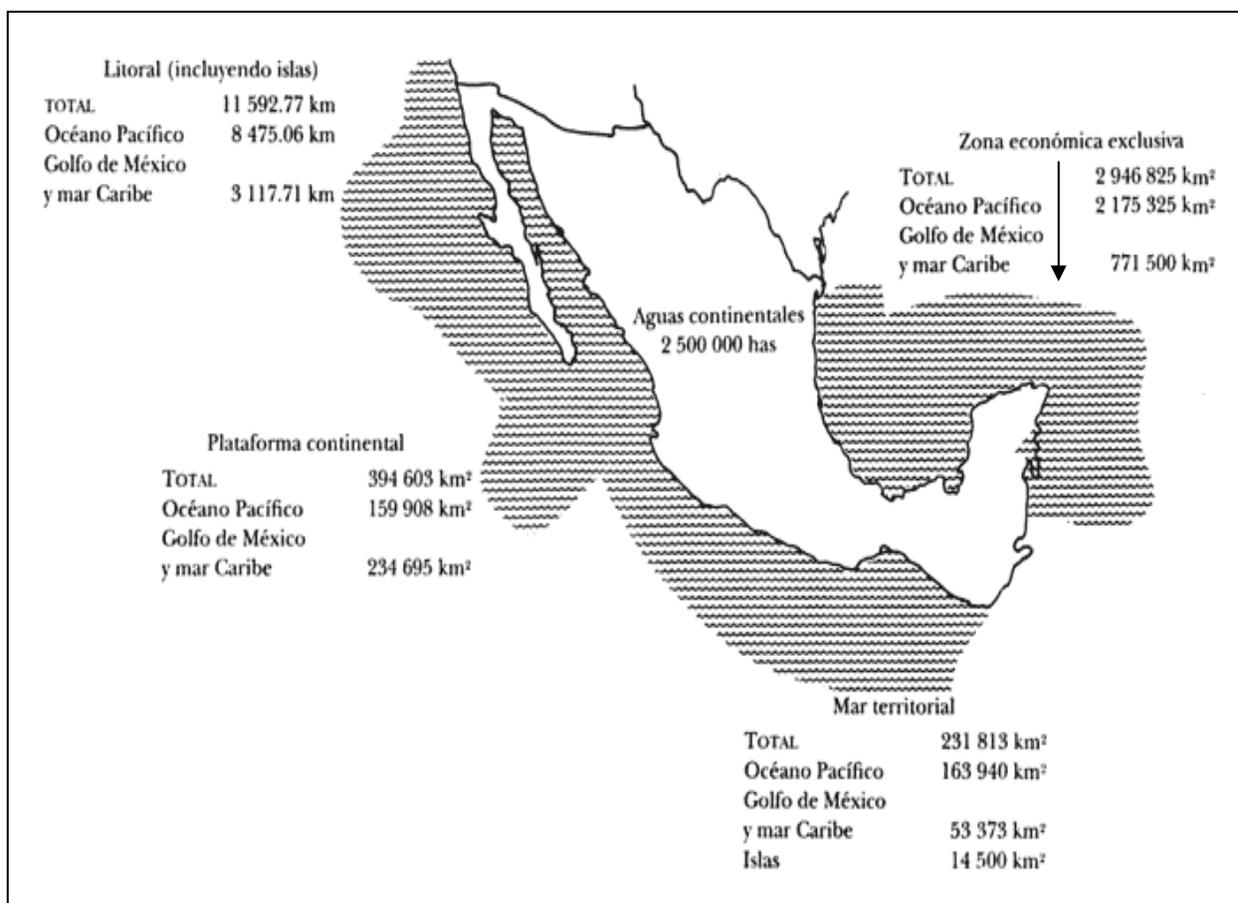


Figura. 1. Mapa de la República Mexicana que indica las 200 millas náuticas como Zona Económica Exclusiva del país.
Fuente: Cifuentes *et al.*, 1997.

Tabla 1. Centros e institutos de investigación en México dedicados al estudio de las Ciencias del Mar.

Nombre de la institución	Dirección electrónica
<p style="text-align: center;">CICESE</p> <p>Centro Superior de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada</p>	<p style="text-align: center;">http://oceanologia.cicese.mx/</p>
<p style="text-align: center;">CICIMAR</p> <p>Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas</p>	<p style="text-align: center;">http://www.cicimar.ipn.mx/</p>
<p style="text-align: center;">CINVESTAV-IPN</p> <p>Centro de Investigación y Estudios Avanzados (Unidad Mérida).</p>	<p style="text-align: center;">http://www.mda.cinvestav.mx/rm01.htm</p>
<p style="text-align: center;">FACIMAR</p> <p>Universidad de Colima, Facultad de Ciencias Marinas</p>	<p style="text-align: center;">http://www.ucol.mx/docencia/facultades/facimar/</p>
<p style="text-align: center;">ICMYL</p> <p>Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología,</p>	<p style="text-align: center;">http://www.icmyl.unam.mx</p>
<p style="text-align: center;">IIO</p> <p>Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Investigaciones Oceanológicas</p>	<p style="text-align: center;">http://iio.ens.uabc.mx/</p>
<p style="text-align: center;">INAPESCA</p> <p>Instituto Nacional de Pesca</p>	<p style="text-align: center;">http://www.inp.sagarpa.gob.mx/</p>
<p style="text-align: center;">SAGARPA</p> <p>Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación</p>	<p style="text-align: center;">http://www.sagarpa.gob.mx/</p>
<p style="text-align: center;">SEMAR</p> <p>Secretaría de Marina</p>	<p style="text-align: center;">http://www.semar.gob.mx</p>
<p style="text-align: center;">UMAR</p> <p>Universidad del Mar, Oaxaca</p>	<p style="text-align: center;">http://www.umar.mx/1024768/index.html</p>

Los tres grandes dominios que engloban al mundo microbiano son: (a) Archeas, (b) Eubacterias y (c) Eukarya. Dentro de línea evolutiva de las eubacterias se encuentra la clase *Actinobacteria*, orden *Actinomycetales* que contiene más de 60 géneros. Los actinomicetos (nombre genérico) son bacterias Gram-positivas de un alto contenido de guanina y citocina -G+C- (Logan, 1994). La repercusión práctica de estos microorganismos es considerable ya que son la fuente principal de la mayoría de los antibióticos naturales de importancia en la medicina (>70%; Maldonado, 2007a,b). De 1990 a 1994 más de 1,000 nuevos metabolitos secundarios fueron descritos y caracterizados únicamente a partir de actinomicetos. A la fecha, aproximadamente 6,000 antibióticos han sido descritos, de los cuales 4,000 provienen de actinomicetos y siguen siendo descubiertos a una velocidad de 500 por año (Demain, 2000). Los actinomicetos son esenciales en la mineralización de la materia orgánica y han demostrado que pueden degradar una enorme cantidad y variedad de compuestos orgánicos. Microorganismos marinos de la clase *Actinobacteria* han sido dominados principalmente por los géneros *Micromonospora*, *Rhodococcus* y *Streptomyces* (Maldonado *et al.*, 2005b). Dentro del suborden *Streptomyicineae*, se encuentra el género *Streptomyces*, el cual es el más conocido y estudiado de todos los actinomicetos. Estos microorganismos se encuentran ampliamente distribuidos en todos los ambientes (terrestres y marinos) y son por excelencia los mejores productores de antibióticos (Prescott *et al.*, 1999). Es evidente que el estudio de estreptomicetos en las aguas mexicanas promete ser un importante tema de investigación para el país, así como un prometedor recurso natural de posible explotación económica.

De lo mencionado anteriormente se desprende la justificación del presente estudio. En este trabajo se escogió a los estreptomicetos como grupo de estudio ya que su importancia económica y médica radica en la producción de una gran cantidad de metabolitos secundarios (Bibb, 2005). El extraer este recurso biológico de los sedimentos marinos implica una fuente importante y virtualmente inagotable para la obtención de nuevos productos. El estudio de la presencia de estreptomicetos en aguas mexicanas pudiera ser un recurso de investigación filogenético, médico, microbiológico y molecular inexplorado muy importante para el país, ya que al encontrar nuevas especies, es altamente probable que pueden producir nuevos metabolitos.

2. ANTECEDENTES

Históricamente, los actinomicetos han sido aislados en su mayoría a partir de muestras de suelo, y generalmente se pensaba que su ocurrencia en el océano era debida a que las esporas que estos microorganismos producen eran acarreadas hacia el mar (Jensen *et al.*, 2005). Ahora existe evidencia que apunta a que varias especies son autóctonas del ambiente marino, en particular aquellas pertenecientes al género *Salinispora* (Maldonado *et al.*, 2005a) y por tanto presentan una serie de adaptaciones a éste. Sin embargo, la distribución y el papel ecológico de los actinomicetos tanto del ambiente terrestre como del marino permanecen como un tema no resuelto dentro de la microbiología (Jensen *et al.*, 2005).

Mincer *et al.* (2002), reportaron el descubrimiento de un nuevo grupo de actinomicetos marinos estrictos para el cual el epíteto genérico “*Salinospora*” (*sic*) fue sugerido (originalmente llamado como MAR1). Estudios de sistemática molecular de este taxón, permitió la descripción formal de dos especies: *Salinispora arenicola* y *Salinispora tropica* y el cambio del epíteto genérico “*Salinospora*” por *Salinispora* (Maldonado *et al.*, 2005a). Interesantemente, este grupo bacteriano se ha recuperado de muestras del Atlántico subtropical, el Mar Rojo y el Mar de Cortés sugiriendo una distribución pan-tropical. Todas estas colonias requirieron agua marina para su crecimiento, lo cual indica un alto nivel de adaptación marina. Conjuntamente, este taxón ha probado ser una fuente importante de nuevos metabolitos secundarios (Jensen *et al.*, 2005), así como de presentar la capacidad de producir antibióticos de otras contrapartes terrestres (Udwary *et al.*, 2007).

2.1 Microbiología acuática y marina

La diversidad microbiana incluye la composición genética de los microorganismos, el ambiente o el hábitat donde se encuentran, y su papel ecológico y funcional dentro del ecosistema. La biodiversidad se define como todo lo hereditario basado en la variación en los niveles de organización, desde los genes con una sola población local, hasta especies siendo parte de toda o casi toda una comunidad local, y finalmente hasta las comunidades

por si mismas que forman partes vivas de los ecosistemas multifactoriales del mundo. La diversidad de los procariontes está expresada en términos de la fisiología y el metabolismo (Hunter-Cevera, 1998).

La diversidad microbiana es una parte integral para el correcto funcionamiento de los ecosistemas. Muy poco se conoce de la extensión y función de la diversidad microbiana tanto en los ecosistemas terrestres como en los marinos, pero sobre todo desde que la ecología microbiana fue separada de la ecología en general. Los estudios moleculares de ecología microbiana indican que tal vez solo se han aislado del 1-5% de las especies microbianas (Williamson, 2005; Hunter-Cevera, 1998) y queda más del 95% por descubrir.

Nuestra comprensión de la diversidad microbiana ha cambiado radicalmente como resultado del análisis de DNA presente en los ecosistemas. El uso de las secuencias de ciertas moléculas (genes) altamente conservadas permite inferir relaciones evolutivas y ha permitido establecer taxones que aumentan el conocimiento sobre la extensión de la diversidad microbiana (Bull *et al.*, 2000).

Las bacterias se encuentran en todas partes, incluso en los ambientes más adversos, y se sabe ahora que son los principales productores de oxígeno de nuestro planeta. Por ejemplo, las ventilas hidrotermales, los lodos marinos profundos, los géiseres, las zonas litorales, parecen favorecer el desarrollo de un sinnúmero de grupos bacterianos. Los trópicos son considerados como más ricos en diversidad de especies microbianas que los ambientes boreales o templados. Los actinomicetos son un grupo de bacterias que aparecen altamente distribuidos en zonas litorales y ambientes áridos (Hunter-Cevera, 1998).

Los ambientes oceánicos contienen una multitud de organismos desde bacterias hasta los más grandes mamíferos. La mayor división de los seres vivos en el océano separa los organismos pelágicos (los que viven en la columna de agua) y los bentónicos (los que viven en el suelo marino). El ambiente bentónico incluye al supralitoral, litoral, sublitoral, batial, abisal y la zona hadal. El ambiente pelágico contiene al nerítico (en la costa) y al oceánico (fuera de la costa). La zona nerítica puede subdividirse de acuerdo a la

profundidad del agua en epipelágico (0-200m), mesopelágico (200-1,000m), batipelágico (1000-2000m), abisopelágico (2,000-6,000m) y regiones hadalpelágicas (>6,000). Las especies también se agrupan de acuerdo a sus hábitats de vida en planctónicos (flotadores), nectónicos (nadadores) y bentónicos (que se encuentran arraigados al suelo marino; Figura 2; Kennish, 2001).

Las bacterias marinas son organismos unicelulares, microscópicos (menores a $2\mu\text{m}$ de diámetro). En términos generales se subdividen en autotróficos y heterotróficos. Los primeros derivan su energía a través de la fotosíntesis (fotótrofos) o a través de la oxidación de compuestos inorgánicos (quimiolitótrofos). Las bacterias heterotróficas, saprófitas y parásitas obtienen energía de otros compuestos orgánicos. Las bacterias quimiosintéticas (quimiolitotróficas) son componentes integrales en diversos ciclos biogeoquímicos como del nitrógeno y azufre (Kennish, 2001). Las bacterias epibióticas colonizan la superficie de los sustratos marinos, donde sirven como recursos alimenticios para protozoarios y otros heterótrofos. Un gran número de bacterias vive en los sedimentos del suelo marino, viviendo en zonas tanto aeróbicas como anaeróbicas (Kennish, 2001).

La abundancia y producción de las bacterias va disminuyendo conforme pasan desde la costa (1 a 3×10^6 células/mililitro [cel/ml]) hasta la zona nerítica (10^4 a 10^6 cel/ml). La biomasa bacteriana va de 5 a 10 (microgramos de células por litro [$\mu\text{g C/l}$]) y 1 a $5 \mu\text{g C/l}$ en las costas y zonas neríticas respectivamente. Tendencias similares son evidentes en los fondos marinos, con la más alta cuenta bacteriana (10^{11} células/ cm^3) observada en los sedimentos lodosos de los estuarios y cuentas menores en los sedimentos marinos profundos. La cuenta celular bacteriana así como la abundancia bacteriana también disminuye con el incremento de la profundidad dentro de los primeros 20 cm de la columna de sedimento. El pico máximo de bacterias se alcanza en la interfase sedimento-agua en los primeros 2 cm de los sedimentos del fondo marino y declina progresivamente conforme aumenta la profundidad del sedimento. Hay una alta correlación entre estas tendencias mencionadas anteriormente y la concentración de materia orgánica presente en la columna de agua y en el fondo de los sedimentos. La cuenta más alta de bacterias y producción de las mismas ocurre en los sedimentos ricos en materia orgánica o concentraciones altas de

carbón orgánico disuelto debido a que en ellos, las bacterias encuentran la mayor cantidad de nutrientes y las mejores condiciones de crecimiento. La densidad de bacterias en la superficie de los sedimentos varía de 1 célula/ $0.3 \mu\text{m}^2$ a 1 célula/ $400 \mu\text{m}^2$. Más bacterias se fijan a los sedimentos finos (arcillas y lodos) que a sedimentos gruesos (arena y grava), que se concentran en grietas y depresiones en los granos (Kennish, 2001).

Las bacterias aeróbicas heterotróficas se encuentran en tres distintos hábitats: 1) la columna de agua (cuerpo de agua uniforme) ya sea flotadoras o adjuntas a las partículas detríticas, 2) en la capa superior de los sedimentos del suelo marino, y 3) en los tejidos de animales y plantas muertas o vivas. Las bacterias anaeróbicas habitan profundidades mayores, capas de sedimentos anóxicos, mares anóxicos caracterizados por una pobre circulación y algunas regiones muy contaminadas. La intensidad de luz en la superficie del sedimento, el grado de turbulencia en el suelo marino, la permeabilidad del sedimento, la bioturbación y el contenido de materia orgánica, afectan la posición de la zona anaeróbica (Kennish, 2001).

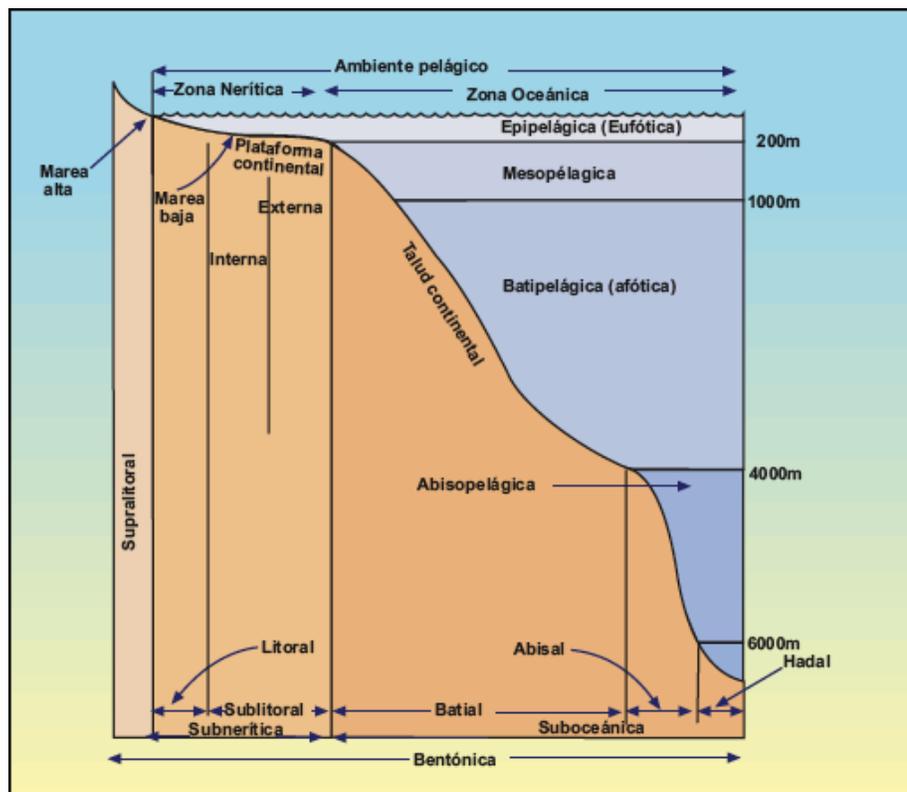


Figura. 2. Clasificación del entorno marino.

Fuente: http://mardechile.cl/educacion/index.php?option=com_content&task=view&id=347&Itemid=31
Septiembre, 2007.

Antes se creía que las bacterias eran pocas en el océano (Pinet, 2003), sin embargo ahora se sabe que esto dista de ser verdad. La evolución de las bacterias marinas a través de billones de años predice que la composición de las comunidades microbianas debe de ser mucho mayor que lo estimado. Se han encontrado miles de distintas clases de microbios en un litro de agua marina y esto es debido al alto nivel de variación genética y fenotípica que tienen. De hecho, las bacterias representan el mayor valor o intervalo de la variación genética y metabólica de los océanos. El papel de las bacterias es vital para la salud de los ecosistemas marinos (Sogin *et al.*, 2006). Las bacterias son críticas en la descomposición de la materia orgánica, ciclaje de nutrientes y otras sustancias, flujos de energía y cadenas alimenticias pues sirven como alimento para la microfauna y macrofauna (Kennish, 2001). Aunque los organismos terrestres comprenden la mayoría de la biomasa del planeta (3200 gigatonnes o más; que es, 10^{15} gramos), el plancton marino (que pesa aproximadamente 0.4 gigatonnes) produce el 45 % del oxígeno total del planeta. La mitad de la fijación de nitrógeno mediada por microorganismos, y la nitrificación y desnitrificación, son procesos claves que se llevan a cabo en los océanos. Los microbios marinos también influyen en la formación de nubes por el ciclaje de compuestos tales como el dimetilsulfuro hacia la atmósfera y también el metano es mediado por los microorganismos que habitan en las superficies de los océanos (Teske *et al.*, 2002). El metabolismo único de los microbios marinos permite que se lleven a cabo muchos de los pasos de los ciclos biogeoquímicos que otros organismos superiores no serían capaces de llevar a cabo. Este funcionamiento permite que la vida continúe en el planeta. Las bacterias marinas también son importantes por que mantienen el balance entre los virus y sus hospederos en los océanos, controlando los crecimientos masivos algales o florecimientos. También los microbios marinos juegan un papel importante y directo en la salud de los corales y otros seres vivos del océano, principalmente por medio de asociaciones simbióticas. Gracias a las rápidas tasas de crecimiento y flexibilidad metabólica, los microbios marinos pueden servir como un buffer que ayude a aminorar los cambios de larga escala resultado de las modificaciones que ha sufrido el océano por el ser humano, tales como el cambio climático (Hunter-Cevera *et al.*, 2005)

Los microorganismos marinos como bacterias, hongos y microalgas han recibido una atención cada vez mayor a lo largo de los últimos diez años. Se ha visto a los microorganismos marinos como un nuevo recurso biomédico y biotecnológico (por ejemplo para la obtención de antibióticos, antitumorales e inmunosupresores). Aunque en el pasado se pensaba que el océano estaba habitado en su mayoría por especies Gram negativas, bacterias Gram positivas han sido encontradas y en algunos casos con un mayor número y desde luego de mayor importancia para el descubrimiento de productos naturales. Fuentes más ricas en nutrientes pueden favorecer más a las Gram positivas mientras los recursos pobres en nutrientes pueden favorecer la aparición de Gram negativas (Davidson, 1995).

2.2 El género *Streptomyces*

A continuación se describen de manera amplia las características que conforman al género *Streptomyces*, así como los fundamentos teóricos de las principales técnicas de detección y aislamiento.

Clasificación científica (Waksman & Henrici, 1943)

Dominio: *Bacteria*

Reino: *Monera*

Filo: *Actinobacteria*

Clase: *Actinobacteria*

Orden: *Actinomycetales*

Familia: *Streptomycetaceae*

Género: *Streptomyces*

El suborden *Streptomycineae* posee una sola familia, la *Streptomycetaceae*, (Anderson & Wellington, 2001) y tres géneros *Streptomyces*, "*Kitasatosporia*"(sic) (Zhang *et al.*, 1997), y *Streptoacidiphilus* (Kim *et al.*, 2003). Sus hifas aéreas (células que crecen

hacia arriba y fuera de la superficie del agar; Koneman *et al.*, 1999) se dividen en un solo plano para formar cadenas de 3 a 50 conidiosporas inmóviles, con una textura superficial que oscila entre lisa, espinosa y verrugosa (Prescott *et al.*, 1999). Todos ellos tienen una pared celular tipo I, es decir, presencia de ácido *LL*-diaminopimélico y glicina. La ausencia de azúcares característicos son típicos de este tipo de pared celular; además de que, el tipo de acilo de los residuos muramílicos en los peptidoglucanos de la pared celular es acetilo (Anderson & Wellington, 2001) y un contenido de G+C es entre 69 y 78%.

El micelio de sustrato (células que se desarrollan sobre la superficie del medio de cultivo y dentro de él; Koneman *et al.*, 1999), cuando está presente no experimenta fragmentación (Figura 3). Los miembros de este grupo bacteriano reciben a menudo en conjunto el nombre de estreptomicetos (del Griego, *streptos*, doblados o torcidos; y *myces*, hongo; Prescott *et al.*, 1999).

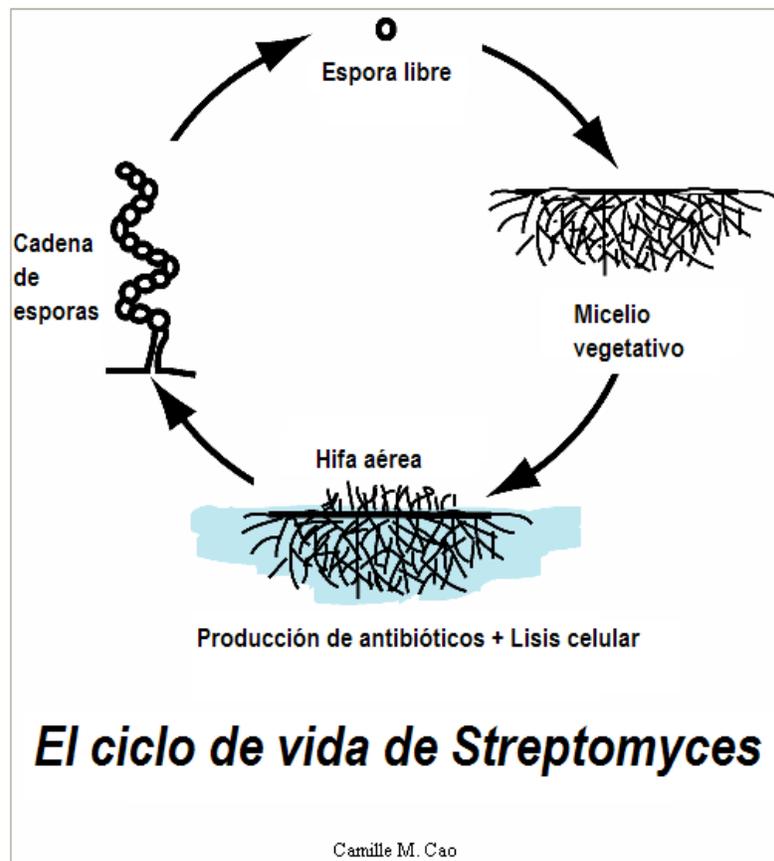


Figura 3. Ciclo de vida de los miembros del género *Streptomyces*.
Fuente: http://biology.kenyon.edu/courses/biol114/Chap11/Chapter_11A.html
Septiembre, 2007.

De 1983 a 1986, seis géneros fueron reclasificados dentro del género *Streptomyces* (*Actinopycnidium*, *Actinosporangium*, *Chainia*, *Elytrosporangium*, *Kitasatoa* y *Microellobosporia*). En 1994, *Kineosporia* y *Sporichthya* se incorporaron al género *Streptomyces* pero después se clasificaron de manera separada. En 1997, *Sporichthya* quedó como un género de la familia *Sporichthyaceae* del suborden *Frankineae* y *Kineosporia* fue agrupado junto con *Kineococcus* en 1998 (Anderson & Wellington, 2001). En 1990, *Streptoverticillium* fue considerado como un sinónimo del género *Streptomyces*, sin embargo este posee un micelio aéreo con un verticilio de tres a seis ramas cortas que se producen a intervalos bastantes regulares. Estas ramas tienen ramas secundarias portadoras de cadenas de esporas (Prescott *et al.*, 1999).

El género *Streptomyces* es enorme, posee 533 especies y 38 subespecies válidamente descritas (Euzéby, 2007). Miembros de éste género son aerobios y forman cadenas de esporas inmóviles con una vaina fina y fibrosa (Prescott *et al.*, 1999). Los conidios de cada cadena a menudo están pigmentados. Normalmente se encuentran más de tres conidios por cadena. Los estreptomicetos forman colonias discretas y liquenoides, algodonosas, o grasosas (Figura 4). Inicialmente, las colonias son relativamente suaves pero después desarrollan una hifa aérea. La mayoría de las colonias muestran temperaturas óptimas entre los 25 y 35°C y crecen mejor entre valores de pH de 5.0 a 8.0. Algunas especies muestran crecimiento a temperaturas psicrófilicas y otras tienen requerimientos ácidos o alcalinos para su crecimiento (Rodríguez, 2004).

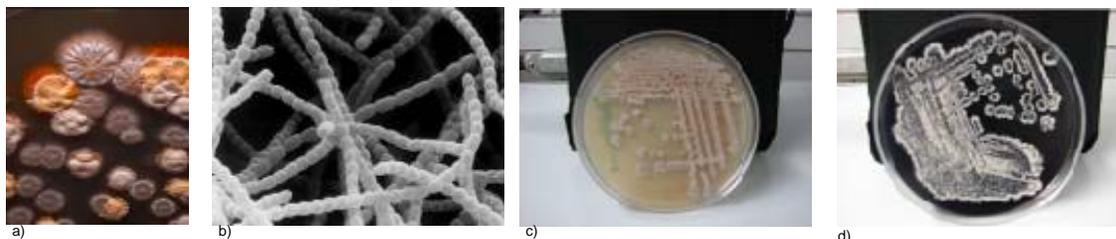


Figura 4. Miembros del género *Streptomyces*. (a) morfología colonial típica; (b) microscopía electrónica (<http://the-half-decent-pharmaceutical-chemistry-blog.chemblogs.org/archives/2007/01/21/sunday-s-family-reunion-the-antitumor-antibiotics>); aislados marinos mexicanos creciendo en diferentes medios de cultivo (c) agar extracto de malta (GYM, del inglés) y (d) glucosa extracto de levadura (GYEA, del inglés).

El hábitat natural de la mayoría de los estreptomicetos es en el suelo, donde constituyen del 1 al 20% de la población cultivable (Prescott *et al.*, 1999). No hay duda que los suelos son los hábitats naturales donde se encuentran las mejores condiciones para su crecimiento y proliferación debido a las siguientes razones:

- 1) Los estreptomicetos son capaces de degradar una compleja gama de residuos de plantas y animales.
- 2) No requieren vitaminas o factores de crecimiento, por lo cual una fuente de nitrógeno inorgánico es suficiente para su desarrollo.
- 3) Encuentran una gran cantidad de superficies que soporten su micelio. Su ciclo de crecimiento: Espora→Micelio→Espora les permite adaptarse a otras condiciones físicas de este mismo hábitat como la tensión y la aireación del suelo que varían dependiendo de las épocas del año.
- 4) Los estreptomicetos producen esporas las cuales contribuyen a su supervivencia en periodos largos de sequía, heladas, presión hidrostática, y condiciones anaeróbicas producidas por la saturación de agua (Korn & Kutzner, 1992).

Las condiciones generales que determinan la presencia de estreptomicetos en el suelo se da por 1) vegetación y contenido de la materia orgánica, 2) tipo de suelo, 3) estación y clima, 4) temperatura, 5) circulación del agua y el aire y 6) pH (Korn & Kutzner, 1992).

La ocurrencia de los estreptomicetos en otros micrositios ha sido reportada en el tracto intestinal de las lombrices de tierra y de los insectos (como la mosca de San Marcos, el milpiés, las cochinillas y las termitas) y en la rizósfera de algunas plantas (Korn & Kutzner, 1992).

En el mar los estreptomicetos se han aislado del suelo tanto en la zona litoral como en el mar profundo (Korn & Kutzner, 1992). La profundidad y la zona de muestreo parecen ser las características más importantes que limitan la presencia de los actinomicetos en el mar:

- El radio de actinomicetos incrementa con la profundidad.

- Los estreptomicetos se han encontrado en mayores cantidades en regiones menos profundas.
- La distribución horizontal y vertical esta correlacionada con la barotolerancia, la halotolerancia y el psicofilismo (Korn & Kutzner, 1992).

Los estreptomicetos desempeñan un papel importante en la mineralización. Son flexibles desde el punto de vista nutricional, y pueden degradar sustancias resistentes como compuestos aromáticos, látex, lignina, pectina, queratina y quitina, lo cual indica un impacto en la biorremediación que estos organismos pueden tener en el ambiente (Prescott *et al.*, 1999).

Especies del género *Streptomyces* se determinan mediante una mezcla de características morfológicas y fisiológicas incluyendo las siguientes: a) el color de los micelios aéreos y de sustrato, b) la disposición de las esporas, c) las características superficiales de la espora, d) la utilización de carbohidratos, e) la producción de antibióticos, f) la síntesis de mielina, g) la reducción de nitrato, y h) la hidrólisis de la urea y ácido hipúrico (Prescott *et al.*, 1999). Sin embargo, para prevenir la sobre-especiación, es necesario usar tanto métodos moleculares y quimiotaxonómicos. Los primeros incluyen la tipificación con fagos, hibridación DNA-DNA, comparación de los patrones de proteínas ribosomales, análisis de fragmentos de restricción de baja frecuencia (Anderson & Wellington, 2001), RFLP 16S-ITS fingerprinting (Lanoot *et al.*, 2005), Box PCR (Lanoot *et al.*, 2004 y Huang *et al.*, 2004), electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de las proteínas celulares (Lanoot *et al.*, 2002) y la comparación de las secuencias de 16S y 23S rRNA (Anderson & Wellington, 2001) y los segundos incluyen únicamente estudios sobre la composición de la pared celular.

La comparación de las secuencias del rRNA es una herramienta particularmente poderosa en la sistemática de las bacterias. Las comparaciones de secuencias de rRNA también han sido útiles para responder a preguntas sobre la transferencia horizontal de genes dentro de los microorganismos. Estos genes son altamente conservados dentro de las bacterias. Tres regiones dentro del gen rRNA 16S han sido estudiadas y estas presentan

suficiente variación de secuencia dentro del género *Streptomyces* (regiones α , β y γ ; Anderson & Wellington, 2001). Los genes 23S y 5S rRNA así como secuencias proteicas ribosomales han sido usados para investigar relaciones de especies dentro del género *Streptomyces*. La comparación de secuencias de genes específicos también ha sido aplicada a la investigación de relaciones de grupos específicos de los estreptomicetos como son los productores de antibióticos. Los genes específicos pueden ser investigados por diferencias a nivel de nucleótidos usando ya sea el análisis de restricción o monitoreando la movilidad del producto usando técnicas especializadas de electroforesis en gel (Anderson & Wellington, 2001).

La reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR, del inglés) es un método para sintetizar grandes cantidades de un segmento específico de DNA a partir de cantidades inferiores a 1 μg del DNA de muestra (y en teoría a partir de una sola molécula de DNA). El PCR multiplica (amplifica) exponencialmente una secuencia específica de DNA bicatenario. Comprende varios ciclos divididos en tres etapas: 1) desnaturalización, 2) hibridación y 3) extensión del cebador (Figura 5). Lo anterior se resume de la siguiente manera: primero se *desnaturaliza* el DNA por calor (aprox. 90 °C), después se baja la temperatura de modo que los extremos 3' de las hebras ahora separadas se puedan aparear con oligodesoxinucleótidos perfectamente complementarios, cuya longitud sea suficiente (20-30 nucleótidos) para formar híbridos estables con la molécula que sirve de plantilla. Estos oligodesoxinucleótidos funcionan como cebadores (*primers*, del inglés), de modo que una polimerasa resistente a la desnaturalización por calor, la polimerasa *Taq* (llamada así por la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, de la que se aisló por primera vez), extiende los extremos 3' de ambos oligonucleótidos utilizando las hebras del DNA bicatenario como plantilla, proceso que se conoce como extensión del cebador o primer. Una última desnaturalización pone fin a un ciclo y da comienzo al siguiente. Al cabo del primer ciclo se obtienen dos moléculas bicatenarias del ácido nucleico original. El ciclo anterior se repite muchas veces (el número óptimo es de 20 a 50 veces en un PCR típico), sin añadir más enzima y usando las moléculas obtenidas en el ciclo anterior como plantilla. De esta forma se produce un aumento exponencial del número de copias de la secuencia específica igual a 2^n , donde n es el número de ciclos. Varios factores son críticos

para el PCR: la concentración de nucleótidos, la especificidad y la longitud de los cebadores (entre 18 y 30 bases) y la concentración del ión magnesio. Por sus características intrínsecas, el método es extremadamente sensible a la presencia de moléculas de DNA contaminante, que puede dar lugar a amplificaciones inespecíficas (aparición de falsos positivos; Saladrigas *et al.*, 2005).

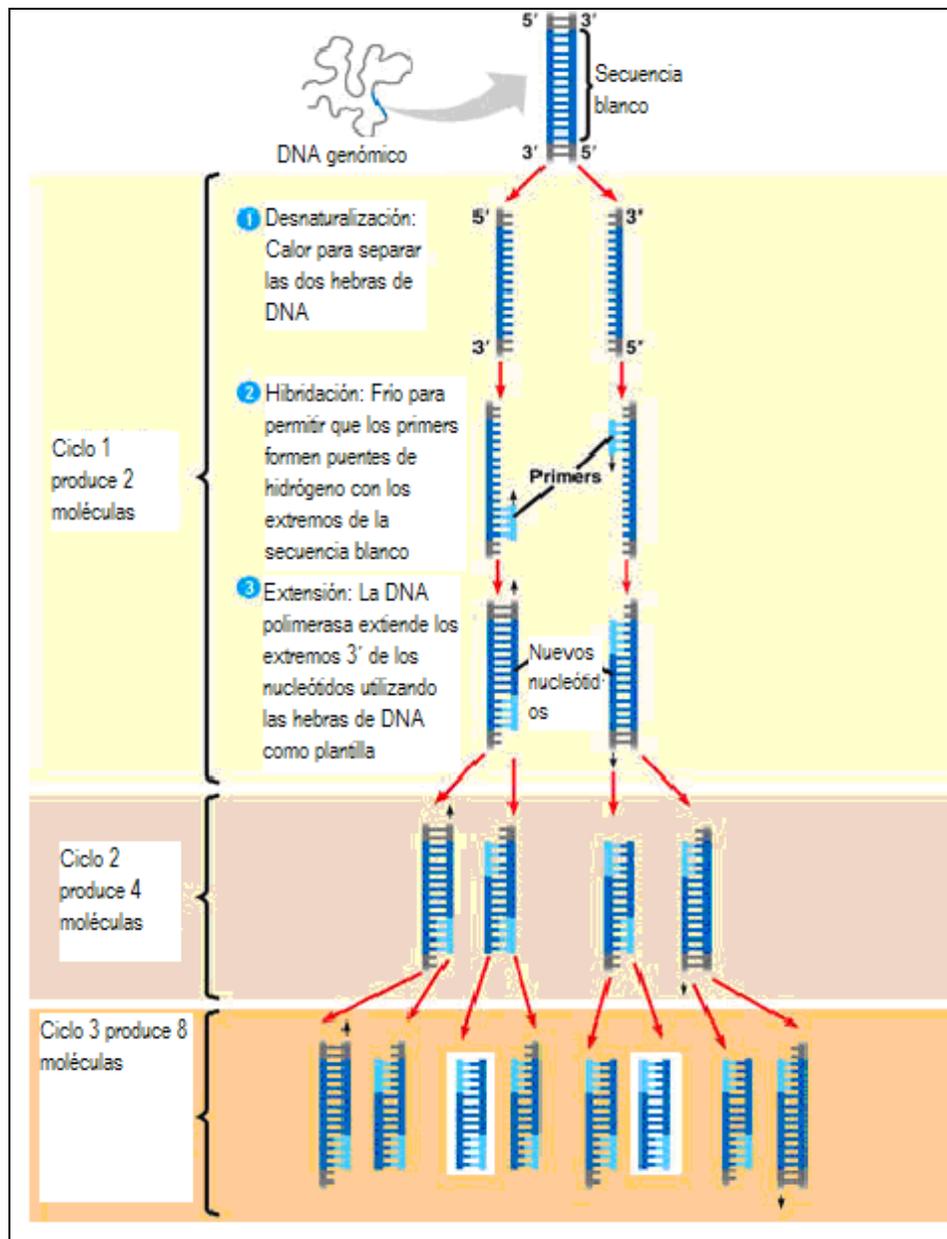


Figura 5. Esquema general de un PCR.

Fuente: <http://scienceblogs.com/insolence/upload/2007/06/PCR.jpg>
Septiembre, 2007.

El PCR anidado o interno es una técnica que conlleva dos reacciones sucesivas en la cadena de la polimerasa, con dos pares de cebadores distintos, de tal modo que los cebadores utilizados en el segundo PCR (interno) flanquean una región genómica amplificada en la primera reacción en cadena (externo). El método del PCR anidado se utiliza sobre todo cuando se tienen pequeñas cantidades del DNA de interés o cuando se quieren evitar las amplificaciones inespecíficas que a veces se observan con el PCR clásico, dado que en cada etapa se realiza un número menor de ciclos (el PCR de muchos ciclos conllevan a menudo errores de lectura y de síntesis, debido, entre otras cosas, a la falta de fidelidad de la *Taq* polimerasa). Además, si el producto del primer PCR es el resultado de una amplificación inespecífica, el segundo par de cebadores internos no reconocerá la secuencia complementaria, y por consiguiente no habrá amplificación (Saladrigas *et al.*, 2005).

La cromatografía en capa fina para el análisis del ácido diaminopimélico es una técnica importante en la clasificación de los actinomicetos que permite separar taxonómicamente los estereoisómeros del ácido diaminopimélico (DAP). La presencia de ácido *LL*-diaminopimélico es una huella específica que permite la identificación de algunos géneros bacterianos incluyendo a *Streptomyces*. El procedimiento consiste en la hidrólisis de las células bacterianas para la obtención de los aminoácidos de la pared celular. En la placa cromatográfica es posible ver los puntos del DAP en una gama de colores del gris, verde y amarillo con el isómero *L* siempre moviéndose adelante del isómero *meso*. Los aminoácidos aparecen morados o rojos y migran delante de los puntos del DAP (Staneck & Roberts, 1974).

El secuenciamiento del DNA es la determinación del orden de bases en una molécula de DNA. Existen dos métodos: la degradación química (Maxam-Gilbert) o la síntesis enzimática de la región a secuenciar (Sanger). Un gran avance se ha logrado en la técnica de secuenciación con la introducción de equipos automatizados los cuales son usados para separar productos de las reacciones de secuenciación, detectar y coleccionar (vía computadora) la información de estas reacciones, y analizar el orden de las bases para automáticamente deducir la secuencia de las bases del fragmento de DNA (Hardin, 2001).

Aunque la mayoría de los estreptomicetos son saprofitos no patógenos, unos pocos de ellos se asocian a enfermedades de plantas y animales. *Streptomyces scabies* y *S. caviscabies* (Prescott *et al.*, 1999), *S. acidiscabies* (nombrado así por su capacidad de producir la enfermedad únicamente en suelos con bajo pH) y *S. turgidiscabies* (Loria *et al.*, 2007) causan la roña (lesiones y tumores en los vegetales causados por la producción de un metabolito secundario inhibidor de la biosíntesis de la celulosa (llamado Thaxtomin) de las patatas y remolachas; Loria *et al.*, 2007). *Streptomyces somaliensis* (Skerman *et al.*, 1980) y *S. sudanensis* (Quintana *et al.*, 2007) son los únicos estreptomicetos patógenos conocidos para el ser humano. Se asocian con el actinomicetoma, una infección en los tejidos subcutáneos que produce lesiones y conduce a abscesos, tumefacción e incluso destrucción ósea cuando no es tratada (Prescott *et al.*, 1999). También existen reportes de micetomas subcutáneos en felinos y delfines producidos por *Streptomyces griseus* (Koneman *et al.*, 1999).

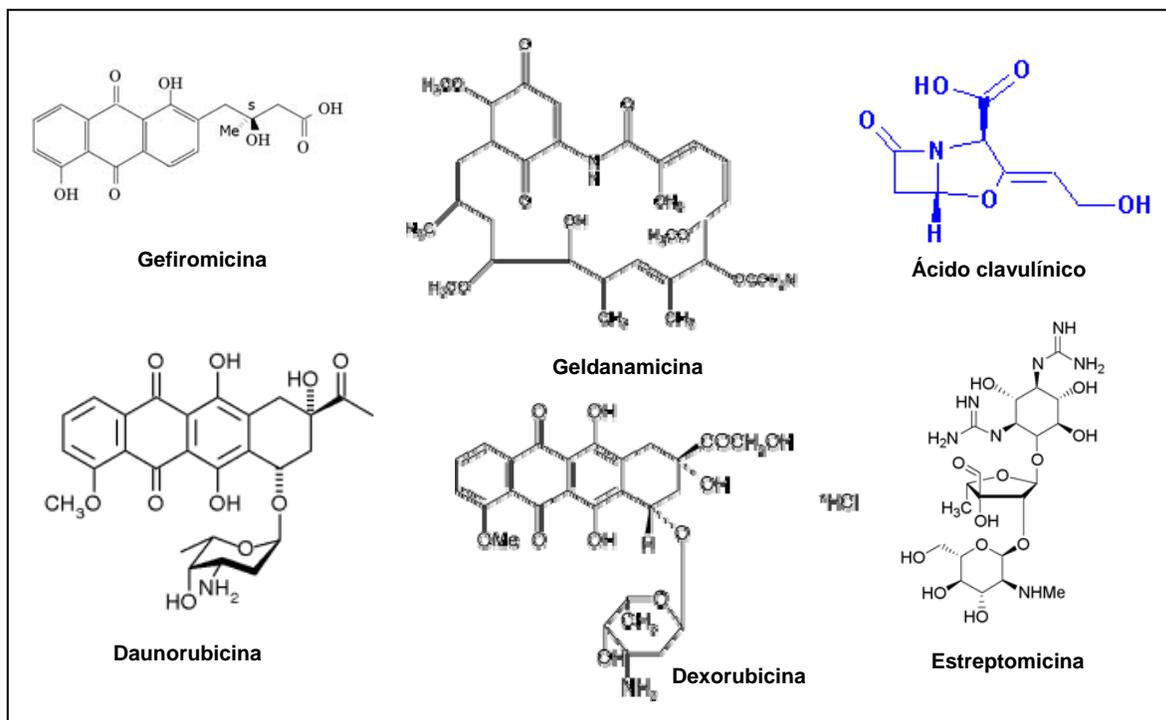
Los estreptomicetos son mejor conocidos por sintetizar una extensa variedad de antibióticos. Son ejemplos la anfotericina B, el cloranfenicol, la eritromicina, la estreptomicina, la neomicina, la nistatina y la tetraciclina (Cuadro 2). Para entender la importancia de la producción de antibióticos por *Streptomyces* basta con saber que el número total de antibióticos producidos por bacterias y hongos es de 10000. Los actinomicetos son responsables de la tercera parte de ese número y dentro de los actinomicetos los estreptomicetos ocupan del 70 al 80% de la producción total de estos metabolitos secundarios (Challis & Hopwood, 2003). *Streptomyces coelicolor* es responsable de la producción de la mayoría de los antibióticos naturales usados actualmente en la medicina humana y veterinaria (>65%; Bentley *et al.*, 2002). La producción de antibióticos no es esencial para el crecimiento de las bacterias y se empiezan a producir cuando ha terminado la fase activa de crecimiento, es decir, cuando el productor está entrando en una fase reproductiva o durmiente (Prescott *et al.*, 1999). Su gama de actividad biológica es amplia, incluyendo la inhibición y la defensa para con otros microorganismos, efectos tóxicos hacia otros organismos multicelulares, plantas o animales (esto es coherente si entendemos que los estreptomicetos son bacterias sin movilidad, por lo que el estrés no

puede ser evitado sino que tiene que ser combatido; Challis & Hopwood, 2003). A pesar de lo anterior, la producción de antibióticos, no sólo está relacionada con la defensa y la competencia por recursos sino también está involucrada en la comunicación entre células y colonias bacterianas. Incluso los antibióticos pueden inducir cambios complejos en la expresión de genes de las bacterias lo cual es un factor de suma importancia en la medicina y en los posibles cursos que las enfermedades infecciosas pueden tomar (Hoffman *et al.*, 2007).

Un ejemplo de lo anterior son los biofilms que son comunidades microbianas que se adhieren y crecen en superficies sólidas, generalmente en contacto con una fase líquida. Los biofilms bacterianos pueden formar estructuras complejas, consistentes en una matrix con canales de agua que permiten el transporte e intercambio de nutrientes y productos de desecho entre el mismo biofilm y el ambiente. Algunas poblaciones bacterianas de estos biofilms pueden producir antimicrobianos que les funciona como un mecanismo de competencia o defensa contra otras bacterias. Un factor que adhiere complejidad a las interacciones dentro de un biofilm es el *quorum sensing* definido como una comunicación entre las células relacionadas por su densidad de una o de distintas especies por medio de pequeñas moléculas señalizadoras difusibles. El *quorum sensing* puede controlar la producción de compuestos antibacterianos, como los antibióticos o las bacteriocinas (Moons *et al.*, 2006). Muchos de estos biofilms protegen a otros seres vivos (por ejemplo el alga *Ulva Lactuca*) contra la colonización de otras bacterias que pudieran resultar dañinas (Rao *et al.*, 2005).

Debido a su importancia en la producción de metabolitos, los estreptomicetos han sido llevados hacia los proyectos de secuenciación del genoma. La secuenciación del genoma completo de estos microorganismos es de vital importancia para el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos y antibióticos, para el entendimiento de principios bioquímicos y evolutivos y para la genética molecular (Janssen *et al.*, 2005). El genoma completo de *S. coelicolor* fue publicado en el 2002. En esa fecha era el genoma bacteriano más grande conocido (Bentley *et al.*, 2002). La secuencia genómica de *S. avermitilis* fue completada en 2003 siendo el primer genoma secuenciado de un microorganismo de uso

industrial (produce las avermectinas, un grupo de agentes antiparasíticos usados en la medicina humana y veterinaria; Ikeda *et al.*, 2003).



Cuadro 2. Estructuras químicas de metabolitos secundarios producidos por miembros del género *Streptomyces* (Bringmann *et al.*, 2005; Raven *et al.*, 2003; Rascher *et al.*, 2002; Lomovskaya *et al.*, 1998).

2.3 Aislamiento selectivo de miembros del género *Streptomyces*

Para el aislamiento de microorganismos se recomienda seguir los siguientes pasos (Korn & Kutzner, 1992):

1. Medio de enriquecimiento y/o selectivo
2. Escoger el material (o muestra) que se considera que contiene los microbios
3. Enriquecimiento y/o pre-tratamiento de la muestra
4. Condiciones de incubación específicas
5. Selección y purificación de microorganismos

Un punto importante a considerar dentro del aislamiento selectivo, es la meta a cumplir y en ésta podemos encontrar:

1. El análisis global de los microorganismos que habitan en diferentes nichos ecológicos
2. El aislamiento de especies específicas en un hábitat determinado
3. El aislamiento de especies directamente productoras de un nuevo metabolito secundario.

La distribución espacial de los microorganismos y la interacción físico-química de los propágulos bacterianos afecta directamente su recuperación y aislamiento. Lo anterior, especialmente cuando se usan métodos tradicionales y/o un sustrato ambiental particularmente complejo. Generalmente la dispersión de los propágulos se realiza agitando el suelo o muestra ambiental en un diluyente líquido, comúnmente agua o buffers suaves como la solución de Ringer. Es muy importante dispersar los agregados porque muchas bacterias, principalmente las que pueden tener un crecimiento micelar, quedan atrapadas entre las partículas agregadas. Procedimientos para promover la disociación de microorganismos de partículas de materia incluye además del uso de los buffers (antes mencionados) otros diluyentes, agentes quelantes, elutriación, e incluso, la ultrasonicación. Sin embargo y aún con el mejoramiento y desarrollo de nuevas técnicas para el aislamiento selectivo, estas técnicas muestran problemas en cuanto a la cuantificación y representatividad de la muestra (Rodríguez, 2004).

El enriquecimiento de la muestra puede realizarse a través de la adición de algunos compuestos químicos, como el carbonato de calcio (CaCO_3), secando la muestra (por aire), haciendo una proporción 10:1 w/w con el CaCO_3 e incubando la mezcla a 26°C por un periodo de 7 a 9 días en una atmósfera saturada con agua. Otro procedimiento es la adición de quitina a la muestra lo que tiene un efecto estimulante sobre los actinomicetos y evita el desarrollo de ciertos hongos (Korn & Kuzner, 1992).

Las esporas de los actinomicetos son muy a menudo resistentes a la desecación por lo que secar las muestras de suelo puede incrementar significativamente las posibilidades de aislar esporaactinomicetos. La resistencia a la desecación es comúnmente acompañada por un grado de resistencia al calor, por lo que el suelo puede ser calentado a más de 100°C para reducir el número de bacterias no deseadas, aunque también calentar la muestra reduce el número de esporaactinomicetos que se pueden recuperar (Rodríguez, 2004).

La filtración por membrana es otro procedimiento ampliamente usado para el aislamiento de estreptomicetos ya sea de agua de mar y/o de sedimento. Colonias de microorganismos se desarrollan entre los poros y los estreptomicetos forman colonias visibles después de dos semanas, mientras que otras bacterias y hongos quedan debajo de la membrana (Korn & Kutzner, 1992). Existen algunos tratamientos químicos o biológicos que incluyen el uso de fenol, que en una suspensión densa de suelo (1.4% por 10 minutos) es efectivo eliminando bacterias y hongos sin afectar a los estreptomicetos (Korn & Kutzner, 1992).

Muchos medios no selectivos han sido recomendados para el aislamiento de estreptomicetos neutrofilicos. Muchos de estos contienen glucosa, glicerol, manitol almidón como fuentes de carbono y arginina o asparagina como fuentes de nitrógeno; la quitina ha sido frecuentemente usada como fuente de carbono y nitrógeno (Rodríguez, 2004). En la Tabla 2 se pueden observar algunos de estos medios. La habilidad de los estreptomicetos de crecer en medios muy pobres como el agar agua, puede usarse como un procedimiento alternativo. Otros nutrientes han sido también utilizados para su aislamiento. Algunos de éstos son degradados por ciertos microorganismos produciendo zonas visiblemente más claras que otras en el medio. El colesterol, la pectina, el plástico, el poli- β -hidroxibutirato y el sulfuro elemental son algunos ejemplos, siendo la pectina y el poli- β -hidroxibutirato los más frecuentemente utilizados por los estreptomicetos (Korn & Kutzner, 1992).

Tabla 2. Medios selectivos y no selectivos usados para el aislamiento de estreptomicetos neutrofilicos.

Mayor constituyente	Agente inhibidor
No selectivo	
Agar Arginina-glicerol-sales minerales	Ninguno
Agar Quitina coloidal-sales minerales	Ninguno
Medio mineral complejo	Cicloheximida y nistatina
Agar glucosa-extracto de levadura-extracto de malta	Cicloheximida
Agar glicerol-caseína-sales minerales	Ninguno
Agar nutritivo de mediana fuerza	Cicloheximida
Selectivo	
Agar almidón-caseína-sales minerales	Cicloheximida y nistatina
Agar almidón-sales minerales	Bacitracina, penicilina y polimixina
Agar almidón-caseína-agua dulce	Cicloheximida
Agar almidón-caseína-cloruro de sodio-sales minerales	Cicloheximida, aerosporina, nistatina y penicilina

Fuente: Rodríguez, 2004.

Es difícil saber que antibióticos o combinaciones de antibióticos pueden ser más efectivos para el aislamiento de actinomicetos. En este sentido, ha sido aplicado con cierto éxito determinar los patrones de sensibilidad de antibióticos de taxones específicos, para después proveer al medio de cultivo con los antibióticos que inhiban a las bacterias no deseadas pero que no afecten y/o estimulen a los actinomicetos. La Tabla 3 muestra los antibióticos principalmente utilizados en medios selectivos para el aislamiento de algunos actinomicetos. Se ha reportado que los compuestos que menos inhiben a los actinomicetos son el sulfato de polimixina B y la penicilina de sodio. Estos compuestos junto con agar almidón caseína resultan un medio de aislamiento efectivo para estreptomicetos, ya que el medio en conjunto con los antibióticos no permite el crecimiento de bacterias no deseadas dando como resultado platos “limpios” apareciendo únicamente aquellas colonias de estreptomicetos identificables fácilmente (Rodríguez, 2004).

Tabla 3. Medios de aislamiento selectivo para actinomicetos.

Agente selectivo	Organismos blanco
Hipurato	<i>Nocardioides spp.</i>
Neomicina y oxitetraciclina	<i>Streptoverticillium spp.</i> (ahora <i>Streptomyces</i>)
Rifampicina	<i>Actinomadura spp.</i>
Tetraciclina	<i>Nocardia asteroides</i>
Rafinosa e histidina	<i>Streptomyces chromofuscus</i>
	<i>Streptomyces cyaneus</i>
	<i>Streptomyces rochei</i>
Melibiosa y penicilina	<i>Streptomyces cyaneus</i>
Dextran y cloruro de sodio	<i>Streptomyces violaceoruber</i>

Fuente: Rodríguez, 2004.

La mayoría de los estreptomicetos son neutrofilicos, por lo que el medio de aislamiento debe ser ajustado a un pH de 7.0 a 7.5. Para los organismos acidofilicos se debe ajustar el pH a 4.5, mientras que para estreptomicetos alcalofilicos el pH debe ser ajustado entre 10 y 11. Los organismos marinos crecen a una temperatura entre 15 y 20° C. Los estreptomicetos autóctonos de suelos se sabe son mesofilicos y son incubados a una temperatura promedio de 28°C. Organismos termotolerantes y termofilicos son aislados a temperaturas mayores (45-55°C). Mientras los termofilicos forman colonias de 2- 5 días, los mesofilicos lo hacen entre 7 y 14 días. Organismos psicofilicos y marinos pueden necesitar hasta 10 semanas para la formación de colonias en los platos de aislamiento (Korn & Kutzner, 1992).

Los estreptomicetos son organismos quimioorganotróficos y sólo necesitan una fuente de carbono orgánico para su crecimiento (como el almidón, glicerol, glucosa y lactato), una fuente de nitrógeno inorgánico (como NH₄⁺ o NO₃⁻) y algunas sales minerales.

Para obtener un crecimiento más rápido son necesarios medios más complejos que contengan por ejemplo avena, extracto de levadura y/o extracto de malta. Otros medios combinan una fuente de carbono orgánico con un solo aminoácido como fuente de nitrógeno (como el ácido glutamínico, arginina y asparagina). Un medio para aislar estreptomicetos debe de permitir completar su ciclo de vida, es decir, la germinación de las esporas, crecimiento del substrato y del micelio aéreo y la formación de esporas; el último es indicado macroscópicamente por la aparición de una gama de colores típicos de las esporas en masa (Korn & Kutzner, 1992).

2.4 Planteamiento del problema

Lo que actualmente conocemos acerca de la biodiversidad microbiana es una mínima parte de lo que conforma la riqueza y variedad de estos organismos en nuestro planeta. Los océanos representan la mayor superficie del planeta (>70%), por lo que son una fuente inexplorable de gran potencial para la búsqueda de nuevos microbios y de nuevos bioproductos que estos pudieran tener la capacidad de producir. México es un país megadiverso (ocupa el tercer lugar entre los países con mayor diversidad biológica) (Retana & Lorenzo, 2002) no sólo en su terreno emergido sino también en sus ricas aguas del Golfo de México, del Pacífico y del Caribe. Algunos microorganismos marinos han mostrado tener adaptaciones a este ecosistema, un hecho que definitivamente los hace distintos (desde un punto de vista metabólico) a aquellos de ambientes terrestres. Estas diferencias radican no sólo en la información genética que seguramente acarrean, sino también en los métodos de aislamiento que deben ocuparse para recuperarlos. Existe, por tanto, una gran necesidad de probar diferentes métodos de aislamiento y detección de microorganismos marinos. Debido a lo poco que se conoce sobre la diversidad microbiana podemos asumir que aún no hemos llegado a conocer todos los productos que los microorganismos pudieran ofrecer para la salud y bienestar de otros seres vivos, en particular para los seres humanos. Nos corresponde a nosotros, explorar y analizar la diversidad microbiana de nuestros mares y océanos con el fin de ampliar el conocimiento científico, con particular énfasis en grupos microbianos cuyas contrapartes terrestres se sabe que son productores prolíficos de compuestos de interés comercial.

2.5 Objetivo general

Aislar e identificar miembros del género *Streptomyces* a partir de muestras de sedimento del Golfo de California y establecer su posición taxonómica

2.6 Objetivos particulares

- Extraer DNA de sedimentos del Golfo de California y detectar la presencia de estreptomicetos.
- Analizar la riqueza de actinomicetos, y en particular de estreptomicetos, en sedimentos del Golfo de California (Pacífico Mexicano)
- Realizar un estudio comparativo entre algunos estreptomicetos terrestres y marinos y establecer su filogenia.

2.7 Hipótesis

Actinobacterias marinas aisladas del Golfo de California inmersas en un ambiente de condiciones extremas, específicas y muy distintas al ecosistema terrestre, es factible que formen un nuevo núcleo taxonómico en el árbol filogenético del género *Streptomyces*

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente trabajo se realizaron estudios microbiológicos y moleculares para el aislamiento e identificación de miembros del género *Streptomyces*. En términos generales, la parte microbiológica consistió: A) en el aislamiento selectivo con cuatro diferentes medios de cultivo, la purificación de los aislados, la extracción de su material genético (DNA), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del DNA extraído, el secuenciamiento del gen rRNA 16S y su posterior análisis filogenético, mientras que la parte molecular consistió: B) en la extracción del DNA presente en los sedimentos marinos para establecer por medio de PCR utilizando primers tanto específicos como universales la presencia de miembros del género *Streptomyces*. La representación gráfica de lo desarrollado en este proyecto se muestra en la Figura 6, así como a la vez se desglosan cada uno de los pasos realizados.

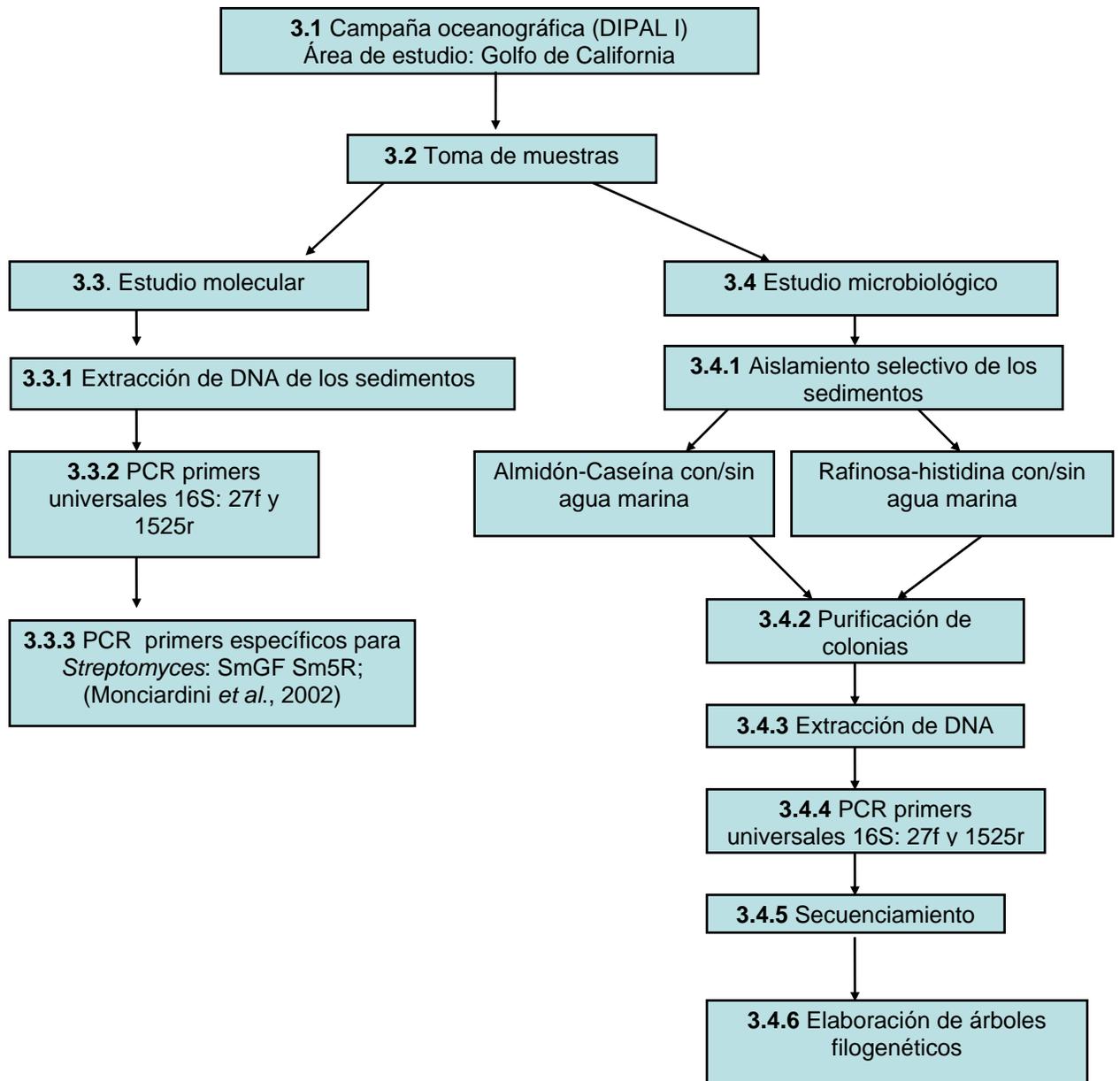


Figura 6. Representación gráfica de la metodología aplicada durante el desarrollo del proyecto.

3.1 Campaña oceanográfica y área de estudio

Las muestras de sedimento marino fueron colectadas durante la campaña oceanográfica DIPAL-I a bordo del buque oceanográfico “El Puma” perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México (Figura 7). El lugar de muestreo fue el Pacífico mexicano, en la zona del Golfo de California o Mar de Cortés, y se seleccionaron 3 muestras pertenecientes a las estaciones de muestreo E24, E48 y E77, las cuales se colectaron a una profundidad de 317, 290 y 310 metros de profundidad respectivamente.

Las fechas de recolección de estas muestras fueron el 24, 26 y 28 de febrero de 2006 (Figura 8).



Figura 7. Buque oceanográfico "El Puma".

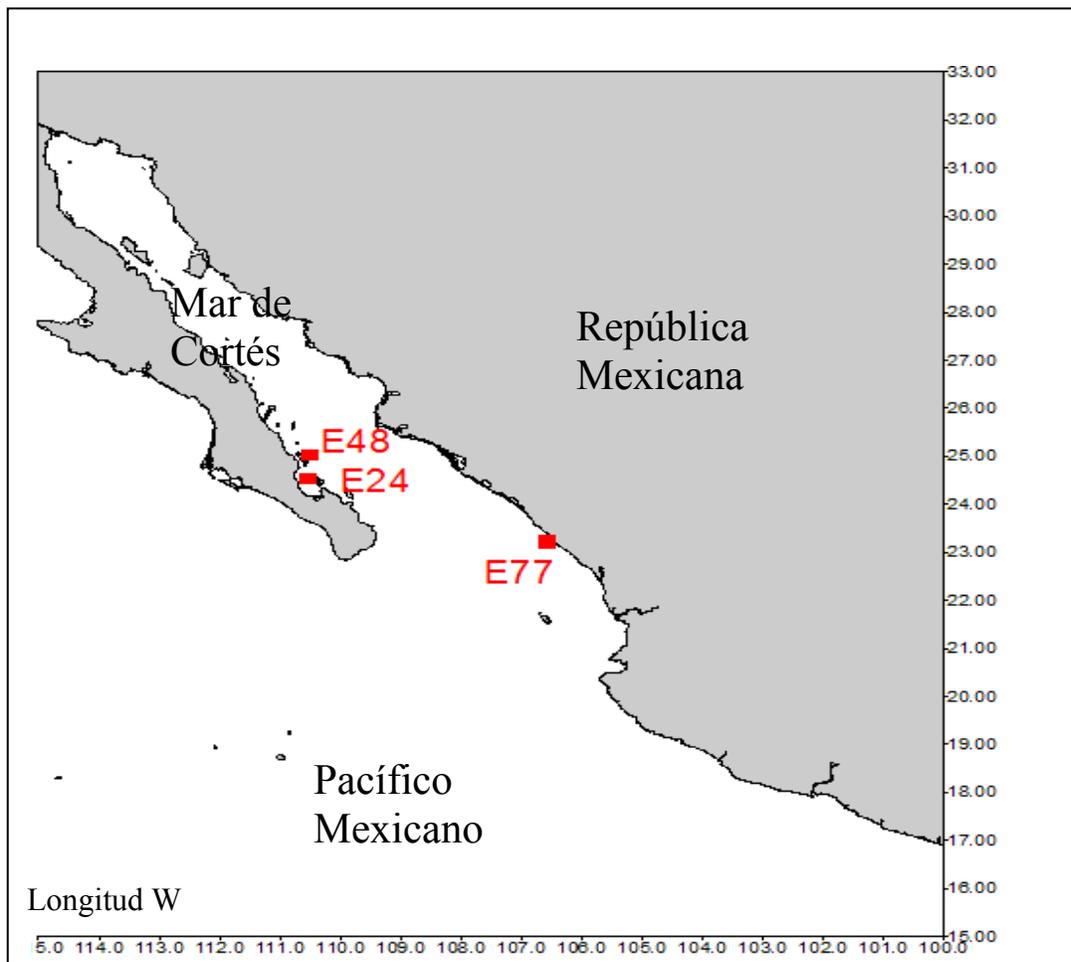


Figura 8. Zona y localización de las estaciones de estudio en el Pacífico mexicano.

3.2 Toma de muestras

La colecta de sedimento marino se realizó por medio de un nucleador de caja tipo Reineck (Figura 9) y la muestra se tomó de la parte superior del sedimento extraído y se transfirió a tubos estériles de 50 ml (Falcon, USA). Las muestras fueron tomadas de forma rápida en un ángulo de 45° con respecto al sedimento, utilizando únicamente el tubo para introducir el sedimento dentro de él (Figura 10). Las muestras se mantuvieron en congelación (-20 °C) durante el periodo de toda la campaña oceanográfica, durante su traslado al laboratorio y en el laboratorio durante su almacenamiento.



Figura 9. Nucleador de caja tipo Reineck.



Figura 10. Técnica de la toma de muestra en la draga Birge Ekman.

3.3 Estudio molecular

3.3.1 Extracción de DNA de los sedimentos marinos

Para obtener DNA de los sedimentos se utilizó el Kit PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratorios, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El procedimiento se detalla a continuación:

1. Se pesaron y se agregaron en 3 tubos estériles, 0.25 gramos de cada una de las muestras, los cuales se centrifugaron por 5 segundos para quitar el exceso de líquido. Se aseguró que después de quitar el líquido con la ayuda de una micropipeta (Gilson, Francia), el peso del sedimento no cambiara (en caso de variación en el peso se agregó muestra hasta obtener el peso deseado).
2. Se transfirió el sedimento a tubos *PowerBead* que se incluyen en el Kit. Estos tubos contienen el búffer que ayuda a separar las partículas del suelo, disuelve ácidos húmicos y protege a los ácidos nucleicos de no degradarse. Además contiene materiales sólidos que ayudan a romper los propágulos. Los tubos se pusieron en un vórtex (Daigger, Vortex Genie 2, EUA) por 5 segundos.
3. Se agregó a cada uno de los tubos 60 µl de la solución C1 la cual contiene dodecil sulfato de sodio (SDS) y otros agentes de disrupción requeridos para completar la lisis celular. El SDS es un detergente aniónico que rompe los ácidos grasos y los lípidos asociados a la membrana celular de varios organismos. Los tubos se mezclaron durante 10 minutos a máxima velocidad con la ayuda de un vórtex.
4. Se centrifugaron los tubos durante 30 segundos a 10000 x g. El sobrenadante se transfirió a tubos de 2 ml (aproximadamente 400-500 µl).
5. Se agregaron 250 µl de la solución C2 a cada uno de los tubos y se mezclaron en el vórtex por 5 segundos más, después se incubaron en hielo por 5 minutos. La solución C2 contiene un reactivo para precipitar el DNA

no orgánico y el material inorgánico incluyendo las sustancias húmicas, desperdicio celular y proteínas. Remover estos materiales es importante para aumentar la pureza de nuestro DNA final.

6. Se centrifugaron los tubos por 1 minuto a 10000 x g. Se transfirió aproximadamente 600 μ l del sobrenadante a nuevos tubos de 2ml.
7. Se agregaron a cada tubo 200 μ l de la solución C3 y nuevamente se mezclaron en el vórtex por 5 segundos, posteriormente se incubaron en hielo por 5 minutos. La solución C3 es otro reactivo que tiene el mismo objetivo que la solución C2.
8. Se centrifugaron los tubos por 1 minuto a 10000 x g cuidando no tomar la pastilla retenida en el fondo del tubo y se transfirió el sobrenadante a nuevos tubos de 2 ml (aproximadamente 600 μ l).
9. Se agregaron 1200 μ l de la solución C4 a cada uno de los tubos y se mezclaron en el vórtex por 5 segundos. La solución C4 tiene una alta concentración de sales, lo cual ayuda a que el DNA se una fuertemente al sílice contenido en una membrana que ayuda a retener el material genético y desechar los contaminantes.
10. Se agregaron aproximadamente 600 μ l del sobrenadante de cada uno de los tubos a los filtros proporcionados en el Kit y se centrifugaron a 10000 x g por 1 minuto.
11. El líquido filtrado se desechó y nuevamente se agregaron 600 μ l del sobrenadante restante, se centrifugó a 10000 x g y se desechó nuevamente el líquido filtrado.

12. Se repitió el paso anterior para un total de 3 cargas en cada uno de los tres filtros utilizados.
13. Se agregaron 500 µl de la solución C5 a cada uno de los filtros y se centrifugaron por 30 segundos a 10000 x g. Se desechó el líquido filtrado. La solución C5 contiene etanol que ayuda a limpiar el DNA que queda unido a la membrana del filtro, quitando sales residuales, ácidos húmicos y otros contaminantes.
14. Los filtros se centrifugaron nuevamente por 1 minuto a 10000 x g. Los filtros se transfirieron a nuevos tubos de 2ml y se agregaron 100 µl de la solución C6 exactamente en el centro de la membrana. Esta última solución es un buffer que permite que el DNA se libere de la membrana de sílice.
15. Se centrifugaron los tubos durante 30 segundos a 10000 x g. Se desecharon los filtros y el líquido recuperado correspondiente al DNA de los organismos presentes en el sedimento marino se resuspendió y se mantuvo a -20°C hasta su uso.

3.3.2 PCR con primers universales

Para revisar la integridad y presencia del DNA extraído, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

3.3.2.1 Preparación del gel de agarosa

Se disolvieron 2.5 g de agarosa en 250 ml de amortiguador Tris-ácido bórico-EDTA (TBE) 1X (ver Apéndice) y con la ayuda de una parrilla de calentamiento con agitación constante se mezclaron y la agarosa se disolvió completamente (el líquido se tornó transparente). Se agregaron 0.75 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml) para la tinción del gel y se vertió la agarosa en la cámara de electroforesis. Una vez polimerizado el gel (aproximadamente en

45 minutos) se retiraron los peines para inmediatamente cargar las muestras como se muestra en la siguiente figura:

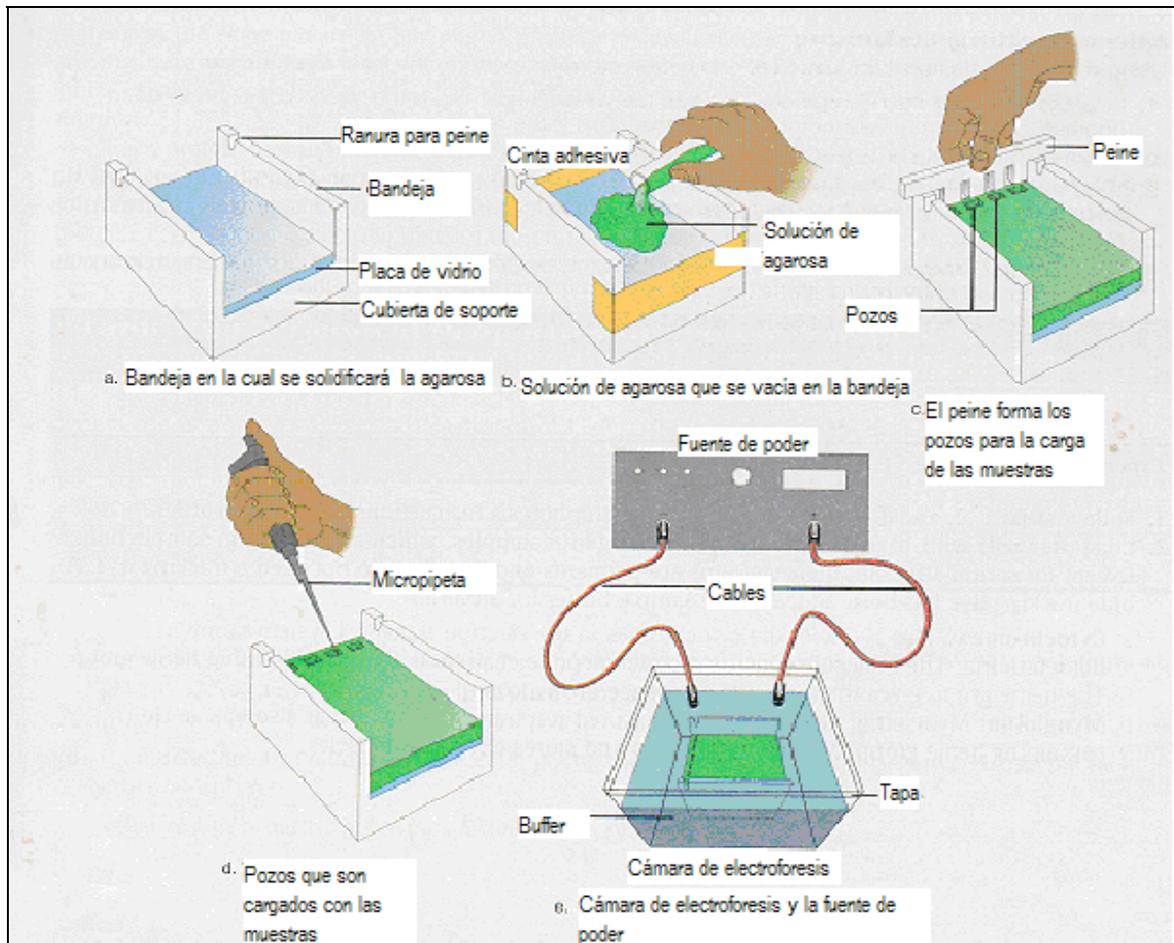


Figura 11. Esquema general para realizar la electroforesis en gel de agarosa.

Fuente: http://a32.lehman.cuny.edu/molbio_course/agarose1.htm

Septiembre, 2007.

Antes de cargar las muestras se agregó a la cámara de electroforesis, amortiguador TBE 1X. Una vez cargadas las muestras y el marcador molecular (Bioline, EUA) se conectaron los electrodos a la fuente de poder (100 V, 35 minutos).

Las muestras para la electroforesis se prepararon como sigue: aproximadamente 4 μ l de buffer de corrida (Bioline, USA) formando una gota por cada muestra y en cada una de las gotas del buffer se agregaron 4 μ l del DNA. Las muestras fueron previamente descongeladas y resuspendidas. Una vez mezcladas cada una de las gotas de buffer de

corrida con aquellas de DNA, se cargó cada una de ellas en su pozo correspondiente en el gel de agarosa. Transcurridos 35 minutos de corrida, el gel se observó con un transiluminador de luz ultravioleta (ProbioTek, México) para confirmar la presencia de DNA en las muestras.

Una vez comprobada la presencia de DNA, se realizó un PCR anidado (Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada) para amplificar exclusivamente el gen del 16S rRNA bacteriano con los primers universales 27f [5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'] y 1525r [5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'] (Rainey *et al.*, 1996). La mezcla de PCR de cada uno de los tubos se describe en la siguiente tabla.

Tabla 4. Mezcla, concentración y cantidades de los componentes de PCR.

Buffer NH ₄ (5X) (Bioline, EUA)	5 µl
MgCl ₂ [50mM] (Bioline, EUA)	1.5 µl
dNTPs [10mM] (Bioline, EUA)	1.25 µl
Primer 1 (27f) [20mM]	0.5 µl
Primer 2 (1525 r) [20mM]	0.5 µl
DNA	0.5-0.7 µl
<i>Taq</i> polimerasa (Bioline, EUA)	0.2 µl
H ₂ O	hasta obtener un volumen final de 50 µl

El programa de PCR se llevó a cabo en un termociclador (Eppendorf, EUA) y consistió en 35 ciclos de 95°C por 10 minutos (“hot-start”), 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto. El producto de PCR de cada muestra se examinó por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1% con el mismo procedimiento mencionado anteriormente (pág. 43). Se obtuvo una banda de aproximadamente 1500 bp que representa la amplificación del material genético bacteriano presente en el sedimento.

3.3.3 PCR con primers específicos para el género *Streptomyces*

Los genes amplificados del 16S rRNA por medio del primer PCR, fueron utilizados como template para un segundo PCR, en donde los componentes para el cocktail fueron los mismos que se mencionan en la Tabla 4, exceptuando que los primers en este caso son específicos para miembros del género *Streptomyces*. Los primers utilizados fueron aquellos descritos anteriormente por Monciardini *et al.* (2002), Sm6F [5'-GGTGGCGAAGGCGGA-3'] y Sm5R [5'-GAACTGAGACCGGCTTTTGA-3']. Las condiciones del programa de éste PCR fueron 95°C por 10 minutos, 94°C por 45 minutos, 65° C por 45 segundos y 72°C por 1 minuto. Los productos obtenidos se identificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% con la técnica descrita anteriormente. En este gel se pudo determinar la presencia de estreptomicetos por la banda característica amplificada con el material genético de las muestras de sedimento (650 bp).

3.4 Estudio microbiológico

Los estudios microbiológicos consistieron en la preparación de cuatro diferentes medios de cultivo, el aislamiento, resiembra y purificación de estreptomicetos del Golfo de California, así como su identificación molecular por medio de árboles filogenéticos para establecer la posición taxonómica de los aislados.

3.4.1 Aislamiento selectivo

Las muestras de sedimento se descongelaron y se realizaron 2 diluciones para la siembra en los medios de cultivo. 10^0 correspondiente a 1 gramo de muestra en 9ml de agua destilada estéril y 10^{-1} correspondiente a 1 ml de la dilución 10^0 en 9 ml de agua destilada estéril. Para el aislamiento de actinomicetos se utilizaron 2 diferentes medios de cultivo: Agar almidón caseína (Okazaki & Okami, 1972) y Agar rafinosa histidina (Vickers *et al.*, 1984) cuyas formulaciones se enlistan a continuación. Cada medio se preparó tanto con agua destilada como con agua marina (Instant Ocean, EUA) para dar un total de 4 diferentes medios de cultivo, los cuales se esterilizaron en una autoclave a una presión interna de 103 kPa, y una temperatura de 121°C durante 30 minutos. Los medios se vaciaron en cajas de Petri estériles que se dejaron solidificar y secar por 24 horas. Para la siembra en placa se tomaron 100 μ l de cada dilución con una micropipeta (Gilson, Francia) los cuales se dispersaron por separado con la ayuda de una varilla acodada de plástico estéril (Figura 12).

Formulaciones de los medios de cultivo utilizados en el proyecto:

Agar almidón caseína (Okazaki & Okami, 1972)

Almidón soluble	10 g
Caseína	0.3 g
Nitrato de Potasio (KNO_3)	2 g
Fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4)	2 g
Cloruro de sodio (NaCl)	2 g
Sulfato de magnesio pentahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.05 g
Carbonato de calcio ($CaCO_3$)	0.02 g
Sulfato ferroso pentahidratado ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.01 g
Agar	15 g
Agua destilada	1L

Agar rafinosa histidina (Vickers *et al.*, 1984)

Rafinosa	10 g
L-histidina	1 g
Sulfato de magnesio pentahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5 g
Sulfato ferroso pentahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01 g
Fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4)	1 g
Agar	15 g
Agua destilada	1L

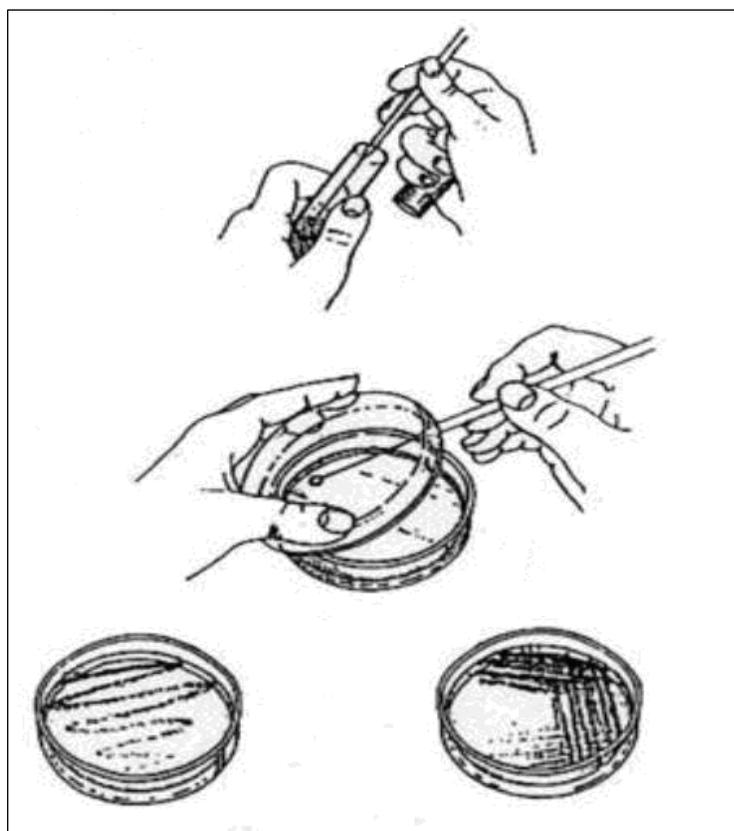


Figura 12. Siembra en cajas de Petri.

Fuente: <http://www.qb.fcen.uba.ar/microinmuno/GUIA.htm>

Septiembre, 2007.

Las cajas de Petri se incubaron a 28°C de tres a cinco semanas aproximadamente. Por las características morfológicas (principalmente la presencia de micelio aéreo y esporulación) se escogieron 20 colonias presuntivamente de la clase *Actinobacteria*, las cuales se consideró presentaban las características macroscópicas típicas de los miembros del género *Streptomyces*.

3.4.2 Purificación de los aislados

Para el crecimiento y caracterización de los estreptomicetos se utilizó el medio agar Avena (Küster, 1959) cuya formulación corresponde a : 20 g de avena comercial y 1 L de agua destilada. La avena se coció en el agua durante 20-30 minutos y se filtró con una coladera. El líquido obtenido se llevó a un volumen final de 1L con agua destilada. Una vez que el medio alcanzó la temperatura ambiente se le agregó 1 ml de solución de sales traza (Shirling & Gottlieb, 1966) y se ajustó el pH a 7.0. El medio se esterilizó en el autoclave bajo las condiciones indicadas previamente. Posteriormente el medio se vertió en cajas Petri. Las colonias seleccionadas como estreptomicetos se resembraron en estas cajas Petri y se incubaron a 28°C por 4 semanas. El procedimiento anterior se repitió cuantas veces fue necesario hasta obtener aislados puros. Una vez purificados, se re-sembraron nuevamente pero esta vez en un medio que no favoreciera la esporulación. La formulación del medio de no esporulación es la siguiente (Sanglier *et al.*, 1992):

Casaaminoácidos	20 g
Almidón soluble	20 g
Extracto de levadura	4 g
Agar	12 g
Agua destilada	1L

Se ajustó el pH a 7.2, se esterilizó en la autoclave y se vació en nuevas cajas de Petri. Una vez sembrados en este medio los estreptomicetos se incubaron a 28°C, durante 2

semanas. Posteriormente la biomasa de cada microorganismo creciendo en estas placas se utilizó para la extracción del material genético.

3.4.3 Extracción de DNA

El método utilizado para la extracción de DNA de los microorganismos fue una extracción fenólica 1:1. Se agregaron 500 µl de buffer Glucosa-Tris-EDTA (GTE; ver Apéndice) a tubos Eppendorf estériles. Se agregó 0.1 µl de perlas de vidrio a cada uno de los tubos Eppendorf y a continuación (en condiciones de esterilidad) se tomó una asada de los microorganismos a partir de las cajas de Petri en el medio de no esporulación. Una vez llena el asa con los microorganismos se introdujo dentro de los tubos depositando todo el material biológico en ellos. Los tubos se pusieron en un vórtex por 15 minutos para romper las células. Se centrifugaron por 10 minutos a 14,500 rpm. Se transfirió aproximadamente 450 µl del sobrenadante a nuevos tubos y se les agregó 450 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, pH 8, 1mM EDTA; Sigma-Aldrich) a cada uno. Los tubos se mezclaron en el vórtex por 3 segundos y se centrifugaron nuevamente por 10 minutos a 14,500 rpm. En los tubos se observaron dos fases; la fase superior se retiró con la ayuda de una micropipeta y se transfirió a nuevos tubos Eppendorf, desechando el tubo que contenía la parte inferior. Dependiendo del volumen obtenido, se agregó la misma cantidad de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, pH 8, 1mM EDTA; Sigma-Aldrich) y los tubos se mezclaron en el vórtex por 3 segundos y posteriormente se centrifugaron por 10 minutos a 14,500 rpm. Nuevamente la parte superior de las dos fases formadas fue transferida a nuevos tubos Eppendorf y se desechó el tubo conteniendo la parte inferior. Se agregaron 500 µl de etanol absoluto (96-100%) frío a cada tubo y posteriormente se invirtieron 3 veces suavemente. Cuando fue posible, el DNA fue visible después en este paso (hebras blanquecinas). Los tubos se mantuvieron a 4°C por 24 horas y posteriormente se retiraron del refrigerador, se centrifugaron por 10 minutos a 14,500 rpm y el líquido se decantó. El DNA (pastilla) concentrada en el fondo del tubo se lavó agregando 200 µl de etanol al 70%, este paso se repitió dos veces. En ambas ocasiones después de agregar el etanol al 70% los tubos se centrifugaron a 14,500 rpm y el líquido se descartó por decantación. Para eliminar cualquier residuo de etanol los tubos se secaron invirtiendo el

tubo sobre papel absorbente durante 4 horas. Después se agregó a cada tubo 50 µl de buffer TE 1X y se dejaron a temperatura ambiente por 30 minutos. La visualización del DNA se realizó por electroforesis como se describió previamente (pág. 43). El DNA se congeló a -20°C hasta su posterior uso.

3.4.4 PCR con primers universales

Una vez comprobada la presencia de DNA en cada uno de los tubos se realizó un PCR para la amplificación del gen 16S rRNA, siguiendo las condiciones de reacción mencionadas anteriormente (pág. 42).

3.4.5 Secuenciamiento

El producto de PCR (gen 16S rRNA) obtenido en el paso anterior se purificó directamente utilizando el Kit de purificación NucleoSpin Extract Kits (Macherey-Nagel, Alemania) o el Kit DNA Purification Kit (Qiagen Ltd, Inglaterra) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos purificados del gen 16S rRNA fueron analizados con una electroforesis en gel de agarosa para asegurarse de la presencia de DNA en las muestras y para estimar las concentraciones del DNA por comparación de DNA estándar de concentraciones conocidas. Los productos del gen del 16S rRNA se conservaron a -20°C hasta que fueron enviados a secuenciar. Se secuenciaron 8 microorganismos. Aproximadamente 2 µg del producto de PCR purificado fue necesario para cada reacción de secuenciamiento. El secuenciamiento se llevó a cabo por Macrogen en la República de Corea de acuerdo con la siguiente metodología: La secuenciación en ciclos de los fragmentos del 16S rRNA purificado fue llevado a cabo usando el Kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits con AmpliTaq FS DNA Polymerase (Applied Biosystems, EUA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La secuencia completa en longitud de todos los genes del 16S rRNA fue determinada en ciclos separados de reacciones de secuenciamiento usando los primers oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para el secuenciamiento del gen 16S rRNA.

Primers	Secuencia (5' → 3') ^a	Tamaño	Sitios de unión ^b		Procedimiento ^c		Fuente
			5'	3'	PCR	Seq	
MG1f	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	20	8	27	*		Lane, 1991
MG3f	CTACGGGRSGCAGCAG	16	342	357		*	Chun y Goodfellow, 1995
MG5f	AAACTCAAAGGAATTGACGG	20	907	926		*	Chun y Goodfellow, 1995
1525r	AAGGAGGTGWTCCARCC	17	1544	1525		*	Lane, 1991

Fuente: Chun y Goodfellow, 1995.

^a De acuerdo con Lane, 1991: M= A/C, R= A/G, S= C/G, W=A/T, Y=C/T.

^b Numeración de acuerdo al sistema de numeración de *Escherichia Coli*

^c PCR= primers utilizados en las amplificaciones del gen 16S rRNA, Seq= primers utilizados en el secuenciamiento en ciclos DyeDeoxy del gen 16S rRNA amplificado

3.4.6 Construcción de árboles filogenéticos

Las secuencias nucleotídicas obtenidas del secuenciamiento fueron visualizadas y editadas con el programa Chromas que permite observar la secuencia resultante. Posteriormente la secuencia fue importada en el programa Phytit (que permite alinear en base a la estructura secundaria del gen 16S rRNA; Maldonado, comunicación personal). Para la comparación de las secuencias obtenidas se recuperaron secuencias de estreptomicetos a partir de bases de datos de libre acceso (National Center for Biotechnology Information, NCBI, del inglés, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se alinearon y tomaron en cuenta para este estudio todas las secuencias descritas por Tamura *et al.* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se compararon las secuencias obtenidas del NCBI con las secuencias obtenidas de los estreptomicetos aislados de las muestras del Pacífico Mexicano y se creó una matriz de similaridad entre especies del género *Streptomyces* y los aislados del ambiente marino. Se construyeron los árboles filogenéticos con el método del “vecino más cercano” (Neighbor-Joining; Saitou & Nei, 1987).

4. RESULTADOS

4.1 Estudio molecular

Un total de 3 muestras de sedimento marino fueron analizadas y procesadas para la detección de material genético (DNA) de estreptomicetos. La extracción de DNA de los sedimentos reveló la presencia de material genético, con el cual se llevó a cabo un PCR anidado con los primers universales 27f y 1525r (Rainey *et al.*, 1996). Las bandas características del gen 16S rRNA obtenidas de la comunidad bacteriana (de aproximadamente 1500 bp) se observan en la Figura 13.

El segundo PCR, con primers específicos para el género *Streptomyces* (SmGF y Sm5R; Monciardini *et al.*, 2002) se realizó a partir del producto amplificado del PCR anidado. Las bandas obtenidas (aproximadamente 650 bp) pueden observarse en la Figura 14. Esto indica la presencia de estreptomicetos en los sedimentos por métodos moleculares tanto en la muestra E24 como en la E48. Cabe mencionar que en la muestra E77 no fue posible amplificar la banda representativa del género *Streptomyces*.

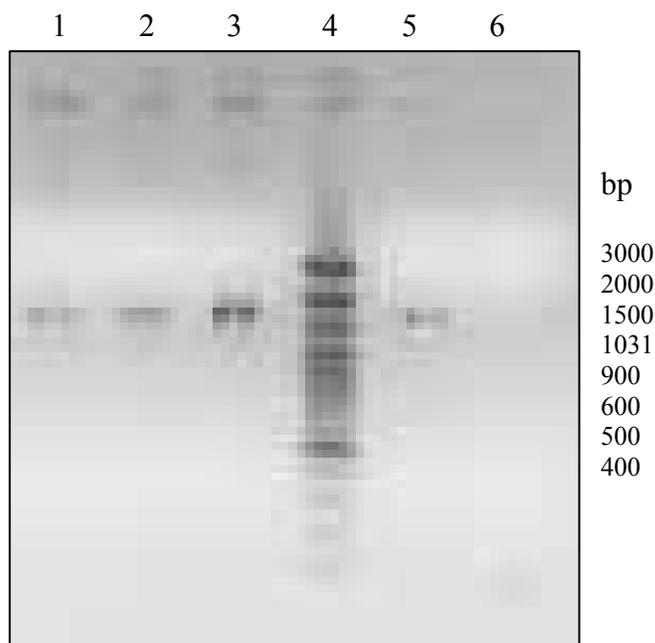


Figura 13. Productos de PCR de muestras de sedimento del Golfo de California. Muestras: 1) E24, 2) E48 y 3) E77, 4) marcador molecular (Bioline, EUA) de 100 bp, 5) control positivo y 6) control negativo.

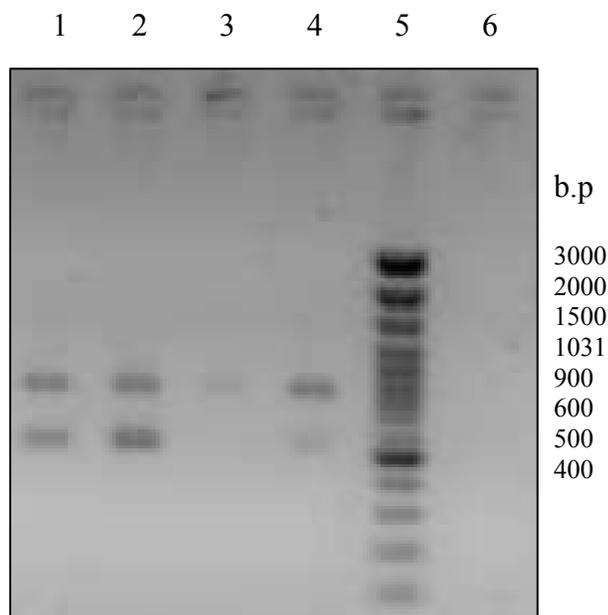


Figura 14. Análisis de gel de agarosa para los productos del PCR anidado de muestras de sedimento para el género *Streptomyces*. Muestras 1) E24, 2) E48 y 3) E77, 4) control positivo, 5) marcador molecular (Bioline, EUA) de 100bp y 6) control negativo.

4.2 Estudio microbiológico

Tres muestras de sedimento del Golfo de California fueron procesadas para el aislamiento de actinomicetos. Las muestras fueron inoculadas en cajas de Petri con los medios de cultivo Almidón-Caseína y Rafinosa-Histidina con y sin agua marina respectivamente. Una examinación a nivel macroscópico reveló la presencia de miembros de la clase *Actinobacteria*, con características típicas como micelio filamentosos, esporas y coloración de las colonias. Cabe destacar que en ambos medios de cultivo hubo un crecimiento bacteriano (presumiblemente de actinomicetos), demostrando así que ambos medios en su formulación contienen los nutrientes y elementos básicos para el crecimiento de los miembros de la clase *Actinobacteria*. Sin embargo, hubo un mayor crecimiento bacteriano en los medios cuya formulación contenían agua marina (se observó un número mayor de colonias de actinomicetos en los medios cuya formulación contenía agua marina). Un total de 20 colonias de actinomicetos fueron purificadas posteriormente en el medio de cultivo agar avena. Estas 20 colonias correspondían morfológicamente a miembros del género *Streptomyces*, químicamente a pared celular tipo I, caracterizada por el ácido

diaminopimélico de forma *LL-A₂pm* y microscópicamente por cadenas de esporas en espiral, por micelio de sustrato ampliamente ramificado y por coloración de las colonias. En la Tabla 6 se enlistan las características morfológicas de los 20 aislados obtenidos.

La Figura 15 muestra algunos de los platos de aislamiento con los medios Almidón-Caseína, Rafinosa-Histidina y agar Avena.

Ocho de los veinte aislados en agar avena en cuya formulación se utilizó agua marina, se caracterizaron por un mejor crecimiento (el número de colonias bacterianas era visiblemente mayor). Sin embargo, los aislados no demostraron ser dependientes de la presencia de cloruro de sodio (NaCl) como otros actinomicetos marinos (por ejemplo el género *Salinispora*) el cual requiere agua marina para su crecimiento. Esto se prueba gracias a que tanto en el medio con agua marina como el medio con agua destilada hubo crecimiento de colonias de presumibles actinomicetos.

Posteriormente los aislados se sembraron en cajas de Petri con un medio de no esporulación. El DNA obtenido a partir de biomasas de los aislados en el medio de no esporulación se realizó con éxito y se puede observar la presencia y cantidad del material genético de los microorganismos en el gel de agarosa de la Figura 16. El PCR del gen 16S rRNA con primers universales (27f y 1525r) se muestra en la Figura 17 y las bandas correspondieron a aproximadamente 1500 pb.

El gen del 16S rRNA de cada uno de los ocho aislados se mandó secuenciar previa purificación con el kit QIAquick PCR Purification kit (Alemania) y siguiendo las instrucciones del proveedor. Las secuencias obtenidas se compararon con aquellas provenientes del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las secuencias del NCBI correspondieron a todas las especies del género *Streptomyces* caracterizadas por Tamura *et al.*, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) por lo cual los nuevos aislados pudieron compararse con todos los miembros terrestres y marinos actualmente conocidos y disponibles en dicha base de datos. Árboles filogenéticos basados en el método del vecino más cercano (Saitou & Nei, 1987) se construyeron con un total de 583 secuencias previo alineamiento manual de

las secuencias recuperadas del NCBI y 8 aislados. La posición filogenética de los aislados se muestra en la Figura 18 y es claramente visible que los nuevos aislados del Golfo de California se separan de todas las especies válidamente descritas del género *Streptomyces*, formando un nuevo núcleo taxonómico. Los aislados 28a-33-6, 28a-33-5, 28a-34-4 y 28a-33-3 se agrupan más cercanamente entre ellos que con los aislados 28a-5-1, 28a-34-3, 28a-41-2 y 28a-33-2. Pero ambos grupos se parecen más entre ellos que entre las especies de *Streptomyces*. Los estudios comparativos mostraron claramente que éstos aislados forman un subgrupo distinto dentro del árbol filogenético del 16S rRNA del género *Streptomyces* lo cual sugiere la presencia de nuevas especies en el ecosistema marino del Golfo de California en las muestras estudiadas.

La matriz de similaridad (Figura 19), nos muestra los porcentajes de similaridad (triángulo superior) y el número de nucleótidos diferentes entre los aislados marinos (triángulo inferior) cuando los estreptomices marinos son comparados con algunos del ambiente terrestre. A excepción del aislado 10 (28a-34-3) que por porcentaje se encuentra más cercano a *Streptomyces mexicanus* (96.5%) todos los aislados marinos están mayormente relacionados entre ellos mismos que con los estreptomicetos terrestres. El número mayor de nucleótidos diferentes lo comparten el aislado 28a-33-6 y *Streptomyces thermogriseus*, mientras que las mayores similitudes en el número de nucleótidos compartidos de nuevo se encuentra en el grupo de los aislados del Golfo de California.

Tabla 6. Características macroscópicas de las colonias en los medios de cultivo Rafinosa-Histidina, Almidón-Caseína y agar Avena.

Medio	Colonia	Características morfológicas	Características morfológicas del aislado en agar Avena
Rafinosa Histidina (I)	1	Anaranjada, cremosa, elevada, brillante, redonda	Anaranjada, brillante, elevada y cremosa
	2	Igual que la 1	Igual que la 1
	3	Anaranjada fuerte, rocosa, redonda	Anaranjada, opaca
	4	Cremosa, opaca, rosada salmón	Igual que la 1
	5	Igual que la 4	Pequeña, anaranjada, cremosa
	6	Algodonosa, elevada, redonda rosa y muy grande	Pequeña, rosa, redondas, casi transparente.
Rafinosa Histidina(II)	7	Rosada salmón, cremosa, opaca, elevada	Anaranjada, brillante, elevada y cremosa
	8	Anaranjada, brillante, elevada	Igual que la 1
	9	Rosada salmón, alargada, cremosa, brillante	Anaranjada, opaca
	10	Algodonosa, elevada, redonda rosa y muy grande	Anaranjada, pequeña, opaca y elevada
Almidón Caseína (I)	11	Elevada, grande, crateriforme, forma de flor	Cremosa, blanca, elevada, brillante
Almidón Caseína (II)	12	Blanca, pequeña, plastificada	Blanca, brillante, elevada
	13	Redonda, pequeña, opaca, plastificada	Pequeña, rosa, opaca

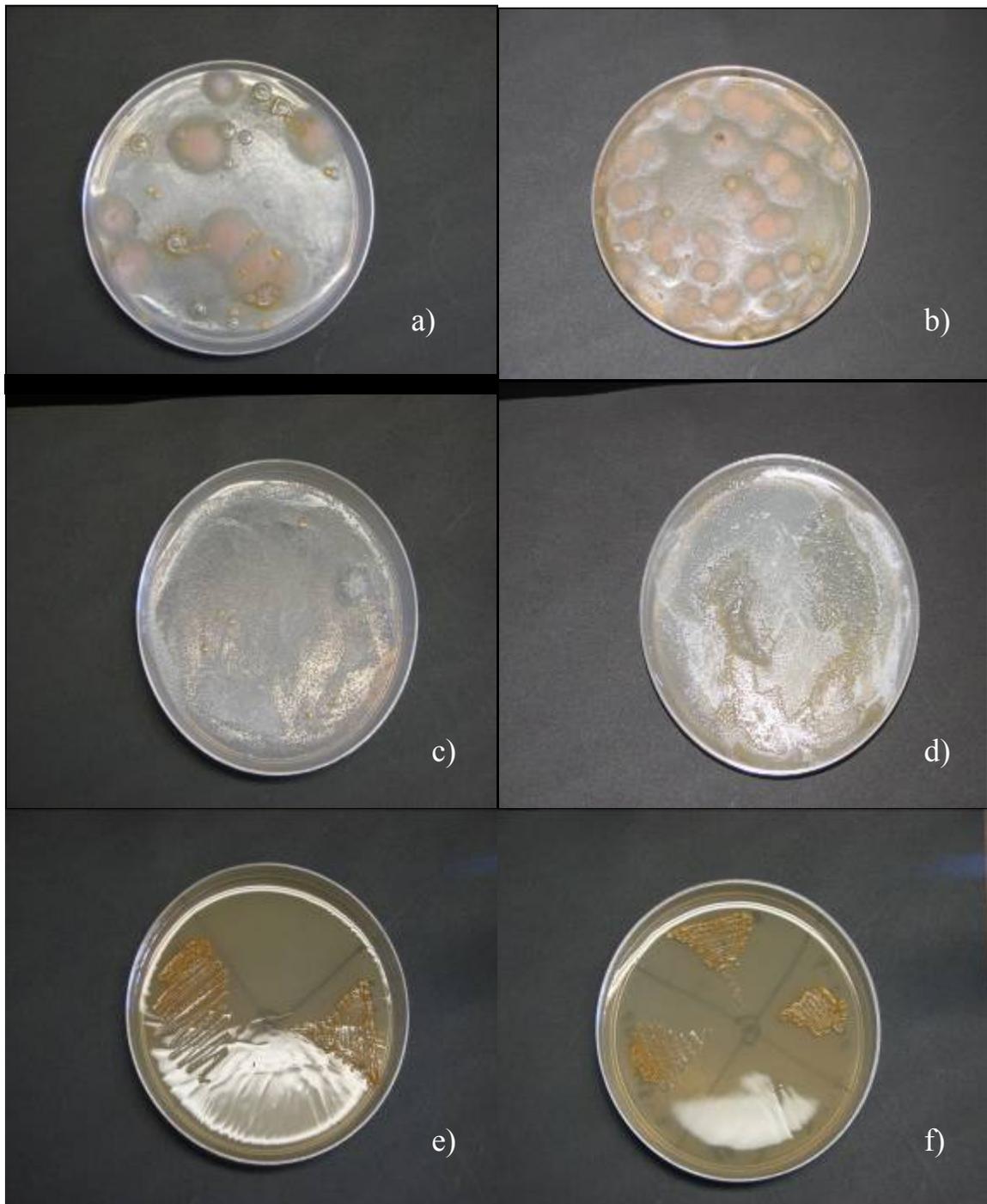


Figura 15. Placas de aislamiento de muestras del Golfo de California (a), (b), (c) y (d) muestran colonias de posibles actinomicetos en medios de Almidón Caseína y Rafinosa-Histidina respectivamente. (e) y (f) muestran placas en cuadrantes con algunos de los aislados de los medios anteriores en medio agar Avena.

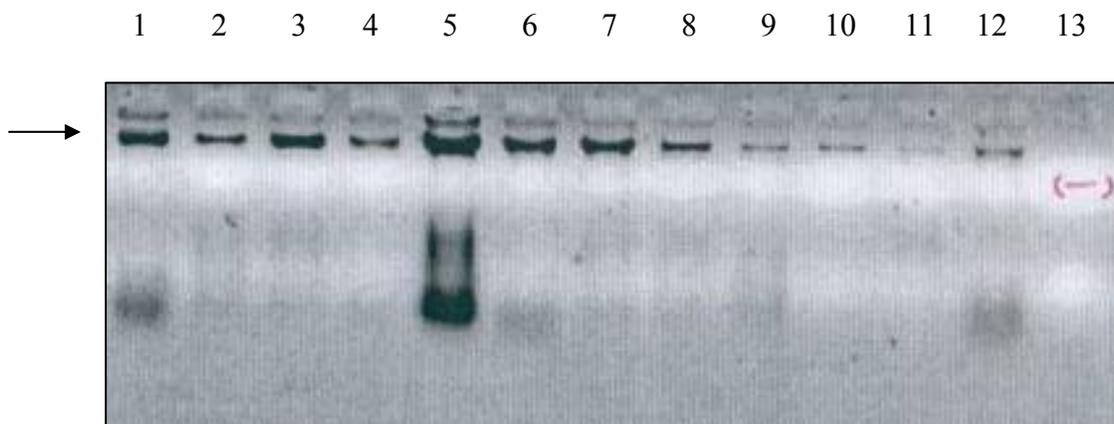


Figura 16. Análisis de gel de agarosa que muestra el DNA extraído de los aislados del Golfo de California. La flecha indica la posición del DNA; 1-11) aislados marinos, 12) control positivo y 13) control negativo

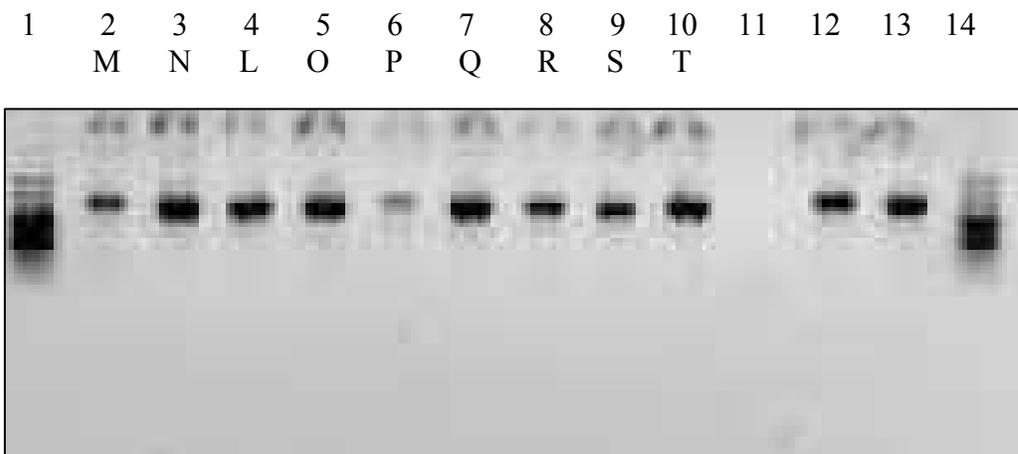


Figura 17. Productos de PCR del gen del 16S rRNA de nueve aislados (presuntivamente) del género “*Streptomyces*” aislados de las muestras del Golfo de California. 1 y 14) Marcador molecular (Bioline, EUA) de 100 bp, 2-10) aislados M, N, L, O, P, Q, R, S, T, 11) control negativo, 12) control positivo (*S. griseus* DSM), y 13) control positivo (*S. violaceoruber* DSM).

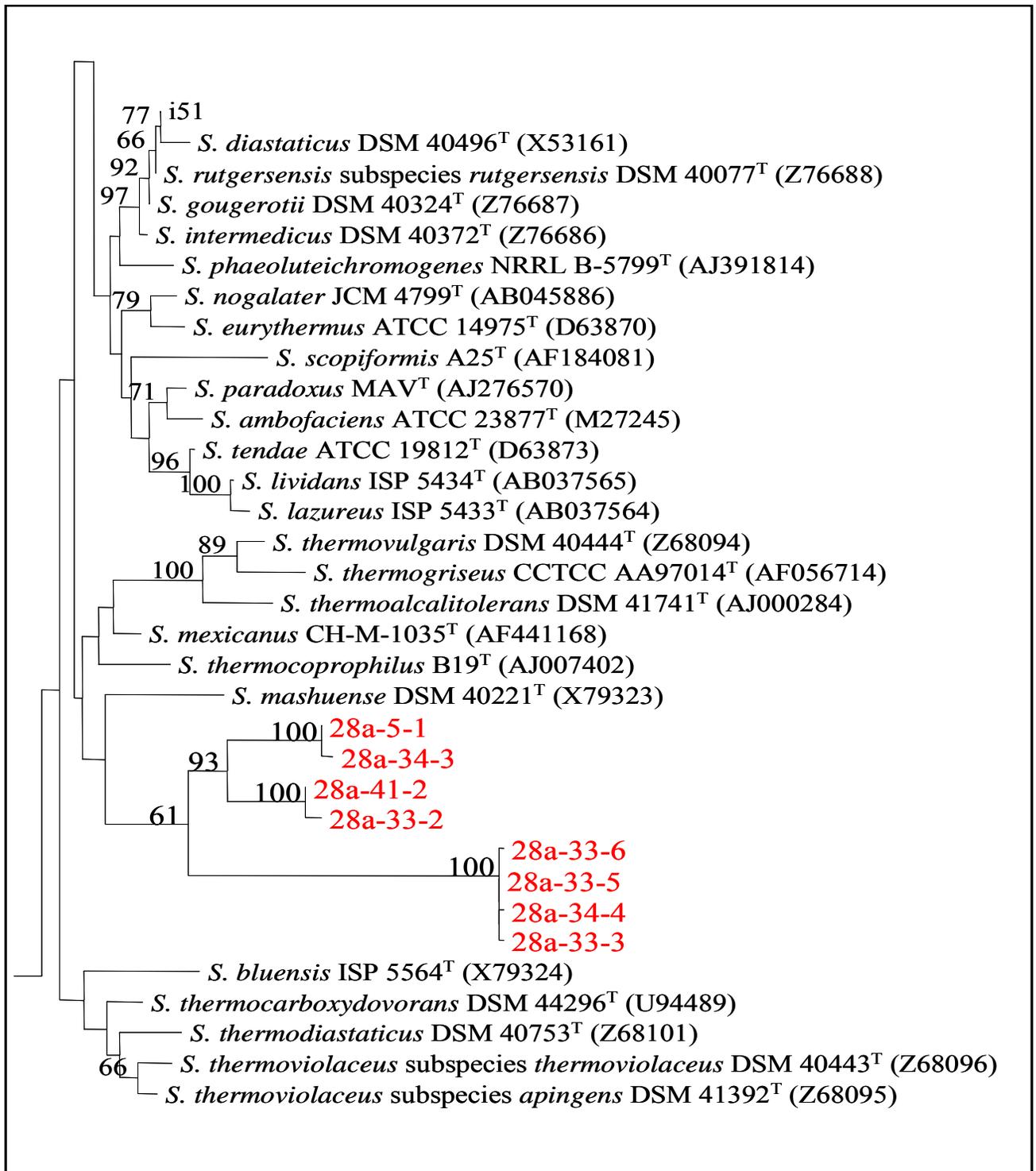


Figura 18. Relaciones filogenéticas entre las secuencias completas del gen 16S rRNA de actinomicetos aislados del Golfo de California (color rojo) y las especies válidamente descritas del género *Streptomyces*. El árbol fue construido usando el método del vecino más cercano (Saitou & Nei, 1987).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	<i>S. armeniacus</i>	---	72	73	71	81	77	72	79	81	88	85	86	82	82	81
2	<i>S. mashuense</i>	95.0	---	43	35	57	50	30	79	81	52	57	50	52	82	81
3	<i>S. thermoalcalitolerans</i>	94.2	96.6	---	33	27	16	26	80	81	63	63	61	59	81	81
4	<i>S. thermocoprophilus</i>	95.1	97.6	97.4	---	44	36	20	85	87	49	57	49	52	86	87
5	<i>S. thermogriseus</i>	94.2	95.9	97.8	96.8	---	15	38	94	96	75	73	73	71	97	96
6	<i>S. thermovulgaris</i>	94.7	96.5	98.7	97.5	98.9	---	27	85	87	69	69	67	67	88	87
7	<i>S. mexicanus</i>	94.9	97.9	97.9	98.6	97.2	98.1	---	76	78	50	55	48	50	78	78
8	28a-33-5	94.4	94.4	93.7	93.9	93.0	94.0	94.6	---	1	74	70	72	64	1	2
9	28a-33-3	94.2	94.2	93.5	93.8	92.9	93.8	94.4	99.9	---	76	72	74	66	3	3
10	28a-34-3	93.9	96.4	95.0	96.6	94.6	95.2	96.5	94.7	94.6	---	31	2	30	75	76
11	28a-33-2	94.1	96.0	95.0	96.0	94.7	95.2	96.1	95.0	94.9	97.9	---	29	2	73	72
12	28a-5-1	94.1	96.5	95.2	96.6	94.7	95.4	96.6	94.9	94.7	99.9	98.0	---	28	75	74
13	28a-41-2	94.3	96.4	95.3	96.4	94.8	95.3	96.4	95.4	95.3	97.9	99.9	98.0	---	67	66
14	28a-33-6	94.3	94.3	93.5	94.0	93.0	93.9	94.5	99.9	99.8	94.8	94.9	94.8	95.3	---	3
15	28a-34-4	94.2	94.2	93.6	93.8	92.9	93.8	94.5	99.9	99.8	94.6	94.8	94.8	95.2	99.8	---

Figura 19. Matriz de similitud entre especies del género *Streptomyces* y los aislados del ambiente marino. Los aislados marinos forman tentativamente un nuevo núcleo taxonómico dentro del género *Streptomyces*.

5. DISCUSIÓN

Los 2,946,825 km² de la zona económica exclusiva de los mares de México no solo representa una fuente de recursos naturales (Cifuentes *et al.*, 1997), sino también uno de los campos más promisorios en las últimas décadas para temas de investigación básica y aplicada. Se estima que la vida en nuestro planeta comenzó aproximadamente 4 mil millones de años, siendo los microorganismos los primeros en aparecer y probablemente los últimos sobrevivientes. Los microorganismos que allí se encuentran son responsables de una serie de servicios ecosistémicos tales como el ciclaje de nutrientes dentro de los ciclos biogeoquímicos y algunos de ellos, como los actinomicetos tienen la capacidad de producir una gran cantidad de metabolitos tanto primarios como secundarios. Aunque existen en México algunas instituciones e institutos de investigación dedicados al estudio del ecosistema marino, éstos no son suficientes para cubrir todo lo que nuestros mares y océanos pueden ofrecer. Sólo el 1% (Williamson, 2005 y Hunter-Cevera, 1998) del total de

los microorganismos que se estima que existen ha podido ser cultivado en el laboratorio. Adicionalmente, sólo una mínima parte de estas instituciones cuentan con líneas de investigación enfocadas a la microbiología acuática y/o marina.

Los océanos al representar la mayor superficie del planeta (>70%) son una fuente con gran potencial en la búsqueda de nuevos microbios de los cuales algunos de ellos presentan genes específicos que han evolucionado en relación a las características del ambiente en el que se encuentran (salinidad, temperatura, presión, disponibilidad de nutrientes, entre otras). Esto a su vez revela el gran potencial que los microorganismos marinos pueden tener para la producción de nuevas moléculas bioactivas, es decir, metabolitos primarios y/o secundarios.

La presencia de actinomicetos en el mar ha sido subestimada y sólo estudios recientes han podido concluir que el recuento de estas bacterias en el medio marino es mucho mayor (Nybakken & Bertness, 2005 y Sogin *et al.*, 2006), por lo que estos microorganismos representan de alguna forma importancia biotecnológica y ecológica en beneficio de la economía y la salud de la especie humana.

Más del 70% de los antibióticos naturales son producidos por actinomicetos (Maldonado, 2007a, b; Demian, 2000; Baltz, 2007). De este porcentaje la tercera parte es producida por los estreptomicetos (Challis y Hopwood, 2003; Demian, 2000; Baltz, 2007). La importancia del estudio y descubrimiento de nuevos estreptomicetos no solo radica en que son los mejores productores de antibióticos y pueden producir nuevos compuestos, sino que también pueden ser utilizados para procesos de biorremediación por que también han demostrado tener la capacidad de utilizar compuestos químicos tóxicos para otros microorganismos y/u organismos superiores (Prescott *et al.*, 1999).

El estudio molecular de este trabajo reveló la presencia de material genético bacteriano dentro de muestras del sedimento del Golfo de California, lo cual es una primera aproximación a la importancia de esta tesis como una muestra de la diversidad genética en

sedimentos marinos mexicanos. El estudio microbiológico permitió no solamente el aislamiento de varios microorganismos sino su estudio a nivel macroscópico y molecular.

Por lo tanto, esta tesis corroboró la utilidad de las técnicas moleculares y microbiológicas para el aislamiento de potenciales taxa nuevos. Especialmente las técnicas de cultivo en medios nutritivos resultó ser una herramienta básica para el aislamiento de las bacterias y la posterior extracción de material genético, así como también la caracterización taxonómica. También las técnicas moleculares nos permiten analizar muestras de sedimento y confirmar la presencia de ciertos grupos bacterianos, incluso aunque las técnicas de cultivo no permitan aislar y/o cultivar dichas bacterias. El uso del gen del 16S rRNA, una molécula altamente conservada, es una de las herramientas moleculares más exitosas en estudios filogenéticos y taxonómicos para Eubacterias. Por lo tanto, la unión de las técnicas moleculares y microbiológicas es necesaria para obtener resultados precisos sobre la diversidad de las bacterias en cualquier ecosistema. Un ejemplo clarísimo de lo anterior fue la detección y aislamiento de posibles miembros del género *Streptomyces* en la muestra E77, y que sin embargo, no se obtuvo una banda positiva en el análisis molecular. Lo anterior puede ser explicado por varios motivos, entre los cuales podemos suponer que la cantidad de DNA obtenido en el primer PCR no fue suficiente para la amplificación del segundo PCR anidado.

En este trabajo se aislaron bacterias del género *Streptomyces* las cuales han sido reportadas previamente no sólo en el ambiente terrestre sino también en el ambiente marino. Sin embargo poco se ha explorado en México y en nuestro conocimiento este es el primer hallazgo de actinomicetos aislados del Golfo de California. Lo anterior es concluyente y está en línea con otros estudios al demostrar que el género *Streptomyces* es uno de los tres géneros (junto con *Micromonospora* y *Rhodococcus*) dominantes en el ecosistema marino. Las muestras recolectadas a 300 metros de profundidad (donde la cantidad de oxígeno es de aproximadamente 1 ml de O₂ por litro y los nutrientes se encuentran disponibles; Nybakken & Bertness, 2005) es un probable indicador de la presencia de estreptomicetos muy especializados. Es probable que la cuenta bacteriana en placa respecto a los estreptomicetos se vea disminuida conforme aumenta la profundidad de

las muestras. Lo anterior si se consideran valores menores a 0.5 ml de O₂ por litro, pero a su vez aumente el número de actinomicetos especializados sobre todo de miembros de los géneros *Micromonospora* y *Rhodococcus*. Futuros estudios que incluyan la comparación entre profundidades podrían comprobar dicha hipótesis. En estos estudios, el análisis de bacterias encontradas en la zona mínima de oxígeno (en donde los valores de oxígeno disuelto en el agua alcanzan los niveles más bajos) entre los 200 y 1000 metros de profundidad serían particularmente interesantes, para comprobar cómo esta pérdida graduada de oxígeno afecta el crecimiento de bacterias, en el especial de miembros del grupo de *Streptomyces*.

Durante el desarrollo de este trabajo, veinte microorganismos de la clase *Actinobacteria* fueron aislados y estudiados tanto por estudios moleculares como microbiológicos. Los aislados corresponden al género *Streptomyces* tanto por pruebas morfológicas como químicas. Las características morfológicas encontradas son concluyentes con la literatura citada. Los actinomicetos, en general son un grupo de bacterias que tienen características morfológicas muy marcadas y que ayudan en la identificación inicial. Precisamente esta identificación morfológica permitió detectar los aislados utilizados en las últimas partes de la metodología. Sin embargo técnicas químicas como la presencia del ácido diaminopimélico son absolutamente necesarias para la detección de grupos específicos dentro de la clase *Actinobacteria* ya que ponen en evidencia ciertas características (en este caso la presencia de una pared celular tipo I) que permiten la identificación de los microorganismos.

Ocho de los veinte aislados presentaron un mejor crecimiento en presencia de agua marina, aunque no fueron dependientes de ella para su crecimiento. Los medios de cultivo utilizados resultaron ser exitosos para el aislamiento de actinomicetos. La utilización del medio de no esporulación es necesaria para poder obtener biomasa bacteriana y por lo tanto, obtener la mayor cantidad de DNA de los aislados. Un futuro estudio que incluya un análisis estadístico (conteo de colonias en placa o conteo de colonias por gramo de muestra) en diferentes medios de cultivo podría ayudar a complementar este trabajo y ser una información básica en la búsqueda de bacterias que no se han aislado aún.

Un estudio filogenético, llevado a cabo gracias a las secuencias obtenidas del NCBI y las secuencias de los aislados del Golfo de California, con base en secuencias del gen 16S rRNA, demostró que estos aislados marinos forman una nueva línea evolutiva dentro de la filogenia de los miembros del género *Streptomyces* lo que sugiere una diferencia genética y por lo tanto fisiológica, con respecto a estreptomicetos de origen terrestre. En el árbol filogenético obtenido en los resultados es clara la separación de este nuevo grupo taxonómico y los porcentajes de similitud confirman que los ocho aislados marinos comparten una relación más estrecha entre ellos mismos que entre ellos y los estreptomicetos de origen terrestre. La diferencia en el número de nucleótidos (encontrados en la matriz de similaridad) demuestra también esta separación entre los aislados del Golfo de California y los demás estreptomicetos.

La descripción del género *Salinispora* y el descubrimiento durante este trabajo de que especies del género *Streptomyces* tienen un mejor crecimiento en presencia de agua marina sugieren que la diversidad de actinomicetos está especializada y adaptada metabólicamente al ambiente marino. Este tipo de estudio es un área que se encuentra aún en etapas iniciales de exploración y por lo tanto representa uno de los primeros trabajos de investigación microbiológica de esta clase en México.

La adaptación al ecosistema marino de las bacterias encontradas en las muestras del Golfo de California permite suponer la evolución de estos microorganismos exclusivamente dentro del ambiente marino y la presencia de nuevos genes. Además considerando la importancia histórica de los estreptomicetos como productores de antibióticos, este nuevo núcleo taxonómico puede representar una fuente importante y nueva de metabolitos secundarios.

La presencia de genes específicos para bacterias marinas es una evidencia más de la evolución que han tenido estos microorganismos completamente separados de las bacterias terrestres, demostrando así que la mayoría de las bacterias marinas son autóctonas y no alóctonas (Jensen *et al.*, 2005 y Maldonado, 2005a). Además, características fisiológicas de

ciertos grupos bacterianos parecen ser un criterio taxonómico muy importante en la clasificación y filogenia bacteriana.

Por lo tanto, el presente estudio no sólo tiene una importancia sobre el descubrimiento de un nuevo núcleo taxonómico sino también tiene una relevancia a futuro sobre distintas ramas de investigación que puedan realizarse en el área de microbiología acuática y marina. Por ejemplo, la detección de genes productores de antibióticos (Wood *et al.*, 2007), pigmentos naturales (Bystrykh *et al.*, 1996) y otros compuestos de utilidad para el ser humano o de importancia biológica para otros seres vivos.

La diversidad microbiana es funcionalmente crítica dentro de los ecosistemas, por lo que el conocimiento de ésta es necesario para dilucidar otros procesos a mayor escala. Por eso, esta clase de estudios son de gran ayuda e importancia en la generación de nuevo conocimiento que contribuirá de forma directa o indirecta al entendimiento conjunto de varios fenómenos que ocurren en la naturaleza.

6. CONCLUSIONES

Durante esta tesis se lograron cumplir los objetivos inicialmente planteados al haber identificado miembros del género *Streptomyces* a partir de muestras del Golfo de California. Se encontraron nuevas especies las cuales se posicionaron taxonómicamente dentro del árbol filogenético de los estreptomicetos. Se detectó DNA de estas bacterias dentro de las muestras del Pacífico Mexicano. Una vez obtenidas las secuencias de los aislados de miembros presumiblemente del género *Streptomyces* se pudieron comparar entre aquellos aislados de ambientes terrestres con los aislados marinos, concluyendo que existe una diferencia significativa taxonómicamente hablando. El uso de agua marina en la formulación de los medios de cultivo fue clave para la detección y el futuro aislamiento de un nuevo núcleo taxonómico y permitió inferir las bacterias se encuentran adaptadas al ambiente marino. La hipótesis se comprobó al encontrar que efectivamente los actinomicetos de origen marino forman un nuevo núcleo taxonómico, debido a los grandes

cambios entre el ambiente marino y terrestre que se ven reflejados en el metabolismo de estas bacterias.

APÉNDICE

A.- Solución amortiguadora de TBE se prepara con 11.16 gr de Tris base, 8.42 gr de ácido bórico, 0.98 gr de EDTA sódico. Se lleva a 1 L de agua destilada y se esteriliza en la autoclave.

B.- El GTE se prepara con 2.27 ml de glucosa al 40%, 2.0 ml de EDTA 0.5 M pH 8, 2.5 ml de Tris- HCl pH 8 y 93.23 ml de agua desionizada para un volumen final de 100 ml.

BIBLIOGRAFÍA

1. Anderson, A.S. & Wellington, E.M.H. 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51: 797-814.
2. Baltz, R.S. 2007. Antimicrobials from actinomycetes: Back to the future. *Microbe*. 2: 125-131.
3. Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, A.M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B. G., Parkhill, J. & Hopwood, D. A. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*. 417: 141-147.
4. Begon, M., Townsend, R.C. & Harper, L.J. 2006. *Ecology. From individuals to ecosystems*. Blackwell publishing, UK. 738 pp.

5. Bibb, J.M. 2005. Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology*. 8: 208-215.
6. Bringmann, G., Lang, G., Maksimenka, K., Hamm, A., Gulder, A.M.T., Dieter, A., Bull, T.A., Stach, E.M.J., Kocher, N., Müller, E.G.W. & Fiedler, P.H. 2005. Gephyromycin, the first bridged angucyclinone, from *Streptomyces griseus* strain NTK 14. *Phytochemistry*. 66: 1366-1373.
7. Bull, T.A., Ward, C.A. & Goodfellow, M. 2000. Search and discovery for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiology and molecular biology reviews*. 64: 573-606.
8. Bystrykh, L.V., Fernández-Moreno, M.A., Herrema, J.K., Malpartida, F., Hopwood, D.A. & Dijkhuizen, L. 1996. Production of Actinorhodin-Related “Blue Pigments” by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*. 178: 2238–2244.
9. Challis, L. G & Hopwood, A. D. 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100: 14555-14561.
10. Chun, J. & Goodfellow, M. 1995. A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45: 240-245.
11. Cifuentes, L.J., Torres G.M. & Frías, M.M. 1997. *El océano y sus recursos IX. La pesca*. Fondo de Cultura Económica. Distrito Federal, México. 182 pp.
12. Davidson, S. B. 1995. New dimensions in natural products research: cultured marine microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*. 6: 284-291.
13. Demain, A.L. 2000. Small bugs, big business: The economic power of the microbe. *Biotechnology Advances* 18: 499-514.
14. Euzéby, P. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. Accessed November 2007. <http://www.bacterio.cict.fr/>
15. Gio, A.R. 1999. La formación de recursos humanos para la oceanografía y las ciencias del mar. *Ciencia Ergo Sum*. 6: 183-189.
16. Goth, A. 1976. *Medical Pharmacology. Principles and concepts*. The C.V Mosby company, San Louis, EUA. 754 pp.

17. Hardin, S.H. 2001. *DNA sequencing*. Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing group, EUA. 5 pp.
18. Hoffman, L., D'Argenio, D., Bader, M. & Miller, S. 2007. Microbial recognition of antibiotics: ecological, physiological, and therapeutic implications. *Microbe*. 2: 175-181.
19. Huang, Y., Li, W., Wang, L., Lanoot, B., Vancanneyt, M., Rodriguez, C., Liu, Z., Swings, J. & Goodfellow, M. 2004. *Streptomyces glauciniger* sp. nov., a novel mesophilic streptomycete isolated from soil in south China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54: 2085-2089.
20. Hunter-Cevera, J.C. 1998. The value of microbial diversity. *Current opinion in microbiology*. 1: 278-285.
21. Hunter-Cevera, J.C., Karl, D. & Buckley, M. 2005. Marine microbial diversity: The key to Earth's habitability. *A report from the American Academy of microbiology*. Washington D.C, USA. 22 pp.
22. Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki Y., Hattori, M. & Omura, S. 2003. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnology*. 21: 526 -531.
23. Janssen, P., Goldovsky, L., Kunin, V., Darzentas, N. & Ouzounis C.A. 2005. Genome coverage, literally speaking. The challenge of annotating 200 genomes with 4 million publications. *European Molecular Biology Organization reports*. 6: 397- 399.
24. Jensen, R.P., Gontang, E., Mafnas, C., Mincer, J.T. & Fenical, W. 2005. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environmental Microbiology*. 7: 1039-1048.
25. Kennish, J. M. 2001. *Practical Handbook of marine science*. CRC Press. New Jersey, USA. 441-444 pp.
26. Kim, S.B., Lonsdale, J., Seong, C.N. & Goodfellow, M. 2003. *Streptacidiphilus* gen. nov., acidophilic actinomycetes with wall chemotype I and emendation of the family *Streptomycetaceae* (Waksman & Henrici (1943) AL) emend. Rainey *et al.* 1997. *Antonie Van Leeuwenhoek* 83: 107-116.

27. Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C. & Winn, W.C. 1999. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas color. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. 1432 pp.
28. Korn, W. F. & Kutzner, H.J. 1992. The Family *Streptomycetaceae*. En Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W y Schleifer, K.H (eds). *The Prokaryotes*. SpringerVerlag Vol I. 921-995 pp.
29. Küster, E. 1959. Outline of a comparative study on criteria used in characterisation of the actinomycetes. *Internationa Bullet of Bacteriology Nomenclature Taxon*. 9: 97-104.
30. Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. En Stackebrandt, E. & Goodfellow (eds). *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley & Sons, Nueva York, EUA. 115-175 pp.
31. Lanoot, B., Vancanneyt, M., Cleenwerck, I., Wang, L., Li, W., Liu, Z. & Swings, J. 2002. The search for synonyms among streptomycetes by using SDS-PAGE of whole-cell proteins. Emendation of the species *Streptomyces aurantiacus*, *Streptomyces cacaoi subsp. cacaoi*, *Streptomyces caeruleus* and *Streptomyces violaceus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52: 823-829.
32. Lanoot, B., Vancanneyt., M., Dawyndt, P., Cnockaert, M., Zhang. J., Huang, Y., Liu, Z. & Swings, J. 2004. BOX-PCR fingerprinting as a powerful tool to reveal synonymous names in the genus *Streptomyces*. Emended descriptions are proposed for the species *Streptomyces cinereorectus*, *S. fradiae*, *S. tricolor*, *S. colombiensis*, *S. filamentosus*, *S. vinaceus* and *S. phaeopurpureus*. *System Applied Microbiology*. 27: 84-92.
33. Lanoot, B., Vancanneyt, M., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Cnockaert, M.C., Dawyndt, Peter., Liu, Z., Huang, Y., & Swings, Jean. 2005. Grouping of streptomycetes using 16S-ITS RFLP fingerprinting. *Research in Microbiology* 156: 755-762.
34. Logan, N. 1994. *Bacterial Systematics*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 272 pp.

35. Lomovskaya, N., Doy, K.Y., Filippini, S., Nastro, C., Fonstein, L., Gallo, M., Colombo, L.A. & Hutchinson R. 1998. The *Streptomyces peucetius* *dpsY* and *dnrX* genes govern early and late steps of daunorubicin and doxorubicin biosynthesis. *Journal of bacteriology*. 180: 2379- 2386.
36. Loria, R., Joshi, M. & Moll, S. 2007. Streptomyces: not just antibiotics. *Microbiology today*. Mayo: 64-67.
37. Maldonado, L.A., Fenical, W., Jensen, P.R., Mincer, T.J., Ward, A.C., Bull, A.T. & Goodfellow, M. 2005a. *Salinispora* gen. nov., sp. nov., *Salinispora arenicola* sp. nov., and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55: 1759-66.
38. Maldonado, L.A., Stach, J.E.M., Pathom-aree, W., Ward, A.C., Bull, A.T. & Goodfellow, M. 2005b. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie van Leeuwenhoek*. 87:11-18.
39. Maldonado, L.A. 2007a. El 70 por ciento de los antibióticos comerciales provienen de un sólo grupo bacteriano. Boletín UNAM-DGCS-469 Ciudad Universitaria. Localizado en red:
http://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2007_469.html
40. Maldonado, L.A. 2007b. Un grupo bacteriano provee 70% de antibióticos. Artículo La jornada. Localizado en red:
<http://www.jornada.unam.mx/2007/08/09/index.php?section=ciencias&article=a03n2cie>
41. Mincer, T.J., Jensen, P.R., Kauffman, C.A. & Fenical, W. 2002. Widespread and persistent population of a mayor new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Applied Environmental Microbiology*. 61: 5005-5011.
42. Monciardini, P., Sosio, M., Cavaletti, L., Chiocchini, C y Donadio, S. 2002. New PCR primers for the selective amplification of 16 S rDNA from different groups of actinomycetes. *FEMS Microbial Ecology*. 42:419-429.
43. Moons, P., Van Houdt, R., Aertsen, A., Vanoirbeek, K., Engelborghs, Y. & Michiels, C.W. 2006. Role of Quorum Sensing and Antimicrobial Component Production by *Serratia plymuthica* in Formation of Biofilms, Including Mixed

- Biofilms with *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 7294-7300.
44. Nybakken, J.W. & Bertness, M.D. 2005. Marine Biology an ecological approach. Person education, Inc., publishing as Benjamin Cummings, EUA. 579 pp.
 45. Okazaki, T. & Y. Okami, 1972. Studies on marine microorganisms. II. Actinomycetes in Sagami Bay and their antibiotic substances. *Journal of Antibiotics*. 25: 461-466.
 46. Pinet, R. P. 2003. *Invitation to Oceanography*. Jones and Berlett publishers, EUA. 331-333 pp.
 47. Prescott, M. L., Harley, P.J. & Klein, A. D. 1999. *Microbiología*. Mc Graw Hill Interamericana, Madrid, España. 525-537 pp.
 48. Quintana, E.T., Wierzbicka, K., Mackiewicz, P., Osman, A., Fahal, A.H., Hamid, M.E., Zakrzewska-Czerwinska, J., Maldonado, L.A. & Goodfellow, M. 2007. *Streptomyces sudanensis* sp. nov., a new pathogen isolated from patients with actinomycetoma. *Antonie van Leeuwenhoek*. Doi 10.1007/s.10482-007-9205-z
 49. Rainey, F.A., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R. M. & Stackebrandt, E. 1996. The Genus *Nocardiopsis* Represents a Phylogenetically Coherent Taxon and a Distinct Actinomycete Lineage: Proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 46: 1088-1092.
 50. Rao, D., Webb, J. S. & Kjelleberg, S. 2005. Competitive Interactions in Mixed-Species Biofilms Containing the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas tunicate*. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 1729-1736.
 51. Rascher, A., Hu, Z., Viswanathan, N., Schirmer, A., Reid, R., Nierman, C.W., Lewis, M. & Hutchinson R. 2003. Cloning and characterization of a gene cluster for geldanamycin production in *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 3602. Federation of European microbiological societies. *Microbiology Letters*. 218: 223-230.
 52. Raven, H.P., Evert, F.R. & Eichhorn, E.S. 2003. *Biology of plants*. W.H Freeman and company worth publishers, New York, USA. 944 pp.
 53. Retana, O.G. & Lorenzo, C. 2002. Lista de los mamíferos terrestres de Chiapas: endemismo y estado de conservación. *Acta Zoológica Mexicana*. 85: 25-49.

54. Rodríguez, C. 2004. Selective isolation and characterisation of novel members of the family *Streptomycetaceae*. PhD Tesis. University of Newcastle upon Tyne, Newcastle upon Tyne, UK. 53-61 pp.
55. Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4: 406-425.
56. Saladrigas, M.V., Claros, M.G. & González, D. 2005. Vocabulario inglés-español de bioquímica y biología molecular. *Panace@*. 263 pp.
57. Sanglier, J.J., Whitehead, D., Saddler, G.S., Ferguson, E.V. & Goodfellow, M. 1992. Pyrolysis mass spectrometry as a method for the classification, identification and selection of actinomycetes. *Gene*. 115: 235-242.
58. Shirling, E.B. & D. Gottlieb. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 16: 313-340.
59. Skerman, V.B., Mc Gowan, V. & Sneath, P.H. 1980. Approved lists of bacterial names. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 30: 225-420.
60. Sogin, M. L., Morrison, H. G., Huber, J. A., Welch, D. M., Huse, S. M., Neal, P. R., Arrieta, J. M. & Herndl, G. J. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103: 12115-12120.
61. Staneck, L.J. & Roberts D.G. 1974. Simplified approach to identification of aerobic Actinomycetes by thin-layer chromatography. *Applied Microbiology*. 28: 226-231.
62. Teske, A., Hinrichs, K.U., Edgcomb, V., Gomez, A., Kysela, D., Sean, P. S., Mitchell, L. S. & Holger, W. J. 2002. Microbial Diversity of Hydrothermal Sediments in the Guaymas Basin: Evidence for Anaerobic Methanotrophic Communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 1994-2007.
63. Tolba, S., Egan, S., Kallifidas, D. & Wellington, M.H.E. 2002. Distribution of streptomycin resistance and biosynthesis genes in streptomycetes recovered from different soil sites. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiology ecology* 24: 269-276.
64. Udvary, D.W., Zeigler, L., Asolkar, R.N., Singan, V., Lapidus, A., Fenical, W., Jensen, P.R., & Moore, B.S. 2007. Genome sequencing reveals complex secondary

- metabolome in the marine actinomycete *Salinispora tropica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104: 10376-10381.
65. Vickers, J.C., Williams S.T. & Ross, G.W. 1984. A taxonomic approach to selective isolation of streptomycetes from soil. In: Ortiz-Ortiz, L., Bojalil, L.F., y Yakoleff, V. (eds), *Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes*. Academic Press, London, 553-551 pp.
66. Waksman, A.S. & Henrici, T.A. 1943. The nomenclature and classification of the *Actinomycetes*. *Journal of bacteriology*. 46: 337-341.
67. Williamson, P. 2005. Can't live without them. *Planet Earth Spring*. 30-32.
68. Wood, S.A., Kirby, B.M., Goodwin, M., & Meyers, P.R. 2007. PCR screening reveals unexpected antibiotic biosynthetic potential in *Amycolatopsis* sp. Strain UM16. *Journal of Applied Microbiology*. 102: 245-253.
69. Zapata, B.F. 2004. *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna*. Editorial Colegio Nacional, 718 pp.
70. Zhang, Z., Wang, Y. & Ruan, J. 1997. A proposal to revive the genus *Kitasatosporia* (Omura, Takahashi, Iwai and Tanaka 1982). *International Journal of Systematic Bacteriology*. 47: 1048-1054.