



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE OLIGOS ESPECÍFICOS PARA LA
FAMILIA *MICROMONOSPORACEAE* Y SU APLICACIÓN
EN AISLADOS DE SEDIMENTOS MARINOS DEL GOLFO
DE CALIFORNIA.**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

LILA LUBIANKA DOMÍNGUEZ RAMÍREZ



MÉXICO, D. F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO.

PRESIDENTE. Profesor: RODOLFO PASTELIN PALACIOS

VOCAL. Profesor: MARÍA GUADALUPE TSUZUKI REYES

SECRETARIO. Profesor: LUIS ÁNGEL MALDONADO MANJARREZ

1° SUPLENTE. Profesor: IRMA RUIZ SILVA

2° SUPLENTE. Profesor: LEÓN PATRICIO MARTÍNEZ CASTILLA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Laboratorio de Biodiversidad y Bioprospección Microbiana, Unidad de Ecología Marina, Ciudad Universitaria, México, D. F.

ASESOR DEL TEMA: Dr. Luis Ángel Maldonado Manjarrez _____

SUSTENTANTE: Lila Lubianka Domínguez Ramírez _____

"A los hombres les encanta maravillarse. Esto es la semilla de la ciencia."

-Ralph Waldo Emerson

"La ciencia se compone de errores, que a su vez, son los pasos hacia la verdad."

-Julio Verne

⌘Agradecimientos⌘

“Un viaje de mil millas comienza con el primer paso.”

Lao Tsé.

Agradezco a mi *alma* Mater: la UNAM y a la Facultad de Química por haber sido parte integral y el pilar de mi formación académica universitaria.

Doy las gracias al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología por abrirme sus puertas y permitirme el acceso a sus instalaciones y al laboratorio de Biodiversidad y Bioprospección Microbiana.

Gracias al Dr. Luis Ángel Maldonado Manjarrez por haber sido mi asesor de tesis y por haberme permitido efectuar en el laboratorio bajo su cargo mi Estancia Tutelada y mi trabajo de tesis.

También agradezco a mis sinodales por su dedicación al revisar mi escrito y por sus valiosos comentarios, sugerencias, observaciones y el tiempo dedicado para enriquecer este trabajo.

Gracias a los compañeros de laboratorio que fueron amables conmigo y también a aquellos que me llegó a encontrar y aún me saludan y platican un rato conmigo. Especialmente a Mariela por haber sido también apoyo en clase de Aplicaciones de Bioquímica y Biología Molecular y buena amiga.

Tampoco he de olvidar a mis amigos que me han acompañado durante toda la carrera (algunos desde la prepa) y que me han brindado su apoyo, su ayuda, su amistad, las risas y tonterías, lo bueno y lo malo. Ustedes siempre hacen que todos los días valgan la pena, ustedes hacen que todo sea más gracioso, más divertido o al menos que se aliviane. Gracias a mis amigos QFBs: Caro, Gabi Contreras, Lalo, Rocío, Gaby Zarco, Perla, Maty y muchos, muchos más; gracias también a las amigas QAs: Ushe, Claudia, Mariel. Igualmente a los compañeros de la SE-QFB por hacer más enriquecedora mi estancia en la Facultad contribuyendo con nuevas experiencias.

Gracias a mis maravillosos profesores, tutores de proyectos, a mi asesora de Servicio Social Ernestina Cervera, mi tutora del subprograma 121 Carmen Urzúa. Gracias también a la Dra. Perla Castañeda y a Lupita de la Coordinación de la carrera de QFB. Gracias a ustedes por sus conocimientos y experiencias, por su apoyo, su disponibilidad, su guía y sus consejos. Gracias por ser excelentes modelos.

También doy gracias a los amigos y compañeros de la Prepa 5 y también a aquellos profesores que marcaron un hito para mí. ¡Alfalfa, vacas y caca! ¡Alfalfa, vacas y caca! ¡Arriba la facultad de Coapa!

*Y un agradecimiento muy especial y desde el corazón a quienes han estado ahí desde siempre: **Mi Familia ♥**.*

Gracias Mamá Osa por aguantarme y soportarme tanto en las buenas como en las malas. Por reír de mis tonterías y de mis ocurrencias. Yo te digo, es en serio, los genios somos incomprendidos. XD jeje. Gracias por haber invertido en mí y echarle tantas ganas al trabajo para que todo vaya bien en casa. Y por supuesto, gracias por siempre estar orgullosa de lo que hago y de lo que soy.

Un buen padre vale por cien maestros.

-Jean Jacques Rousseau

Gracias a mi maravilloso hermano, a mi linda hermana y a mi cuñada tan tierna.

Lenin, siempre has sido una fuente de inspiración para mí, siempre entregado a lo que quieres. También muy ocurrente y gracioso, el terror de todas las Pirañas pero siempre cariñoso. Y luego, ¿por qué será que me dicen que me parezco a ti?...sólo que yo no soy el terror de Piraña.

Ludmila, a pesar de los malos momentos y de los baches por los que hemos pasado como hermanas también has sido parte muy importante para mí, siempre has buscado la manera de acercarte y con tus logros también me has motivado a ser mejor cada día. También has sido una fuente de inspiración.

Paulina, tú también has participado en mi desarrollo como persona. También has sido muy linda y amable conmigo brindándome apoyo, consejos y tu hospitalidad. Y también va por el bellissimo Jules León. Porque los pasos que damos hoy marcarán la dirección del mañana y este pequeñín es todo ternura y amor.

Gracias a mis tíos Elva y Palomo y a mis primos Horacio y Bruno. También han sido un magnífico apoyo.

Y sonará extravagante pero también agradezco a Piraña por estar conmigo ya 12 años y a la Frambuesa. Las dos son también parte importante de lo que soy, son un pañuelo, mi terapia, mis cuidadoras cuando enfermo, mis compañeras cuando salgo a correr, mis niñas alocadas sin prejuicios ni odio, mis amigas, mis perritas. Gracias por soportarme y gracias por su afecto incondicional.

Mil disculpas si no menciono todos sus nombres pero son tantas personas que han contribuido en mi formación que nunca acabaría. Pero igualmente, mil gracias a todos ustedes, mis amigos y mis compañeros en este viaje que es la vida.

A todos ustedes los quiero muchísimo y son una gran fuerza para mí.

"El lugar donde nacen los niños y mueren los hombres, donde la libertad y el amor florecen, no es una oficina ni un comercio ni una fábrica. Ahí veo yo la importancia de la familia."

-Gilbert Keith Chesterton

∞Dedicatoria∞

Este trabajo va dedicado a las personas cuyo afecto y cariño me han dado la fuerza para ser quien soy, quienes me han dado su apoyo y su tiempo. Ustedes han colaborado a formar el corazón que guía mis esfuerzos, mis ideas, mi trabajo, mi ética y mi moral así como mis perspectivas futuras.

∞ A mi familia: Mi maravillosa madre, mi hermano, mi hermana y mi cuñada y al baby, mi sobrino. ¡Lila, Ludmila, Lenin, Pau y Jules León, ustedes son lo máximo!♥ A mis niñas: Piraña y Frambuesa. Y a mis tíos y mis primos: Elva, Palomo, Horacio y Bruno, ustedes también son geniales.

∞ A mis amigos y compañeros, quienes me han enseñado también a ser mejor persona.

∞ A los profesores que han dejado huella en mí, tanto en el bachillerato como de la Facultad.

∞ Y a la memoria de Pelusa. T-T

*“Vivir no es sólo existir,
sino existir y crear,
saber gozar y sufrir
y no dormir sin soñar.
Descansar, es empezar a morir.”*

-Gregorio Marañón

ÍNDICE.

DATOS DEL JURADO.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA.....	vi
RESUMEN.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.	
1.1 Planteamiento del problema.....	1
1.2 Objetivos.....	4
1.3 Hipótesis.....	4
2. MARCO TEÓRICO.	
2.1 Importancia de la Microbiología Marina y la Biología Molecular.....	5
2.2 Empleo de oligos específicos para la identificación bacteriana.....	11
2.2.1 Gen 16S rRNA.....	11
2.2.2 Diseño y aplicación de oligos específicos para la identificación bacteriana.....	13
2.3 Bioinformática, herramienta clave para la Biología Molecular.....	15
2.4 La clase <i>Actinobacteria</i>	18
2.4.1 La familia <i>Micromonosporaceae</i> y su importancia.....	22
2.4.1.1 El género <i>Salinispora</i>	23
2.4.1.2 El género <i>Verrucosispora</i>	27
3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.	
3.1. Materiales y Métodos.....	29
3.1.1 <i>In silico</i> . Alineamientos utilizando el programa BLAST.....	29
3.1.2 <i>In vitro</i>	31
3.1.2.1 Cultivo.....	31
3.1.2.2 Extracción de DNA (método de alcohol isoamílico-fenol-cloroformo)...	32
3.1.2.3 Amplificación mediante PCR.....	33
3.1.2.4 Electroforesis horizontal (gel de agarosa).....	35
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	
4.1 <i>In silico</i> . Alineamientos utilizando el programa BLAST.....	38
Para la familia <i>Micromonosporaceae</i>	38
Para el género <i>Salinispora</i>	39
Para el género <i>Verrucosispora</i>	41
4.2 <i>In vitro</i>	43
4.2.1 Extracción de DNA (método de alcohol isoamílico-fenol-cloroformo).....	43
4.2.2 Amplificación mediante PCR.....	44
4.2.2.1 Programa <i>MICROM</i> y <i>MICROM modificado</i>	44
4.2.2.2 Programa <i>GORD 68 45x3</i>	46
5. CONCLUSIONES.....	51
6. PERSPECTIVAS.....	55
7. RECOMENDACIONES.....	56
8. REFERENCIAS.....	57

RESUMEN

La familia *Micromonosporaceae* agrupa diferentes géneros dentro de los cuales *Micromonospora*, *Salinispora* y *Verrucosipora* son prácticamente indistinguibles con base en sus características morfológicas a nivel macroscópico. Estos tres géneros muestran un desarrollo fisiológico caracterizado por la formación de un micelio de sustrato bien desarrollado y ramificado donde las esporas nacen y crecen una a una a través de la hifa sin la formación de un micelio aéreo. Habitualmente presentan colonias anaranjadas que progresivamente pasan a marrones y después a negras, generalmente con un aspecto mucoso que es indicativo del proceso de esporulación.

Debido al complejo desarrollo que los caracteriza y la dificultad asociada para la diferenciación de estos tres géneros, se requieren nuevos métodos para su identificación y son aquellos basados en biología molecular y la Reacción en la Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) una opción muy plausible para una discriminación rápida entre miembros de estos tres géneros.

En el presente trabajo se evaluaron diferentes juegos de oligonucleótidos (oligos), para PCR, diseñados a partir de secuencias del operón ribosomal rRNA como un método rápido para la identificación de aislados que compartieran características morfológicas típicas de los géneros antes mencionados. Los oligos se evaluaron en cepas de referencia y posteriormente se emplearon sobre una serie de aislados microbianos recuperados a partir de sedimentos del Golfo de California para de esta forma conocer su estatus genérico.

La relevancia de este trabajo se sustenta en el hecho de que los géneros *Micromonospora*, *Salinispora* y *Verrucosipora* son componentes importantes del ecosistema marino. Las estrategias propuestas, basadas en la diferenciación a nivel molecular son necesarias para estudios referentes a la biodiversidad microbiana nacional por considerar que contribuyen a un mejor entendimiento del ambiente marino.

Palabras clave: Actinobacteria, familia *Micromonosporaceae*, géneros *Salinispora* y *Verrucosipora*, PCR, oligos específicos para género.

Evaluación de oligos específicos para la familia *Micromonosporaceae* y su aplicación en aislados de sedimentos marinos del Golfo de California.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Planteamiento del problema.

El mundo microbiano incluye tres grandes dominios de acuerdo a la clasificación de Woese de 1987, basada en secuencias del gen 16S ribosomal (16S rRNA). Uno de esos dominios, *Bacteria*, incluye a su vez numerosas divisiones entre las cuales se encuentra la clase *Actinobacteria* [Stackebrandt *et al.*, 1997]. Algunos miembros de esta clase han sido extensamente estudiados principalmente por ser causantes de enfermedades de alto impacto para la humanidad. Por ejemplo, la tuberculosis es causada por la actinobacteria *Mycobacterium tuberculosis*, esta enfermedad solamente tuvo un declive en sus numerosos casos anuales hasta el descubrimiento de la estreptomycin. Ésta última, un antibiótico producido por un miembro del género *Streptomyces*, hecho curioso es que también se trate de otra actinobacteria.

Dos géneros dentro de este grupo taxonómico son reconocidos particularmente como productores prolíficos de metabolitos secundarios, entre los cuales destacan los antibióticos. Estos géneros son *Micromonospora* y *Streptomyces*. Algunas especies pertenecientes a este último son los modelos en la producción de antibióticos generando cerca del 70 al 80% de los compuestos naturales actualmente caracterizados [Watve *et al.*, 2001; Maldonado, 2007]. Esta versatilidad metabólica podría estar reflejada en otros géneros relacionados filogenéticamente a *Streptomyces* o a *Micromonospora* o análogamente con base en sus perfiles metabólicos [Bull & Stach, 2007].

Ahora bien, de acuerdo a secuencias del gen 16S rRNA los géneros más cercanos a *Micromonospora* son *Salinispora* y *Verrucosipora* (Figura 1) [Maldonado *et al.*, 2005a]; de esta relación estrecha, en términos filogenéticos, podría esperarse una producción análoga o semejante de metabolitos secundarios relevantes al considerar que gran parte de los que produce el género *Micromonospora* son compuestos bioactivos importantes para el hombre con aplicaciones diversas. Por ejemplo, agentes terapéuticos como: antibióticos, inhibidores de enzimas y antivirales [Rusnak *et al.*, 2001; Gutierrez-Lugo *et al.*, 2005] y antitumorales [Kwon *et al.*, 2006], entre otros [Lam, 2006; Bull & Stach, 2007; Williams, 2008].

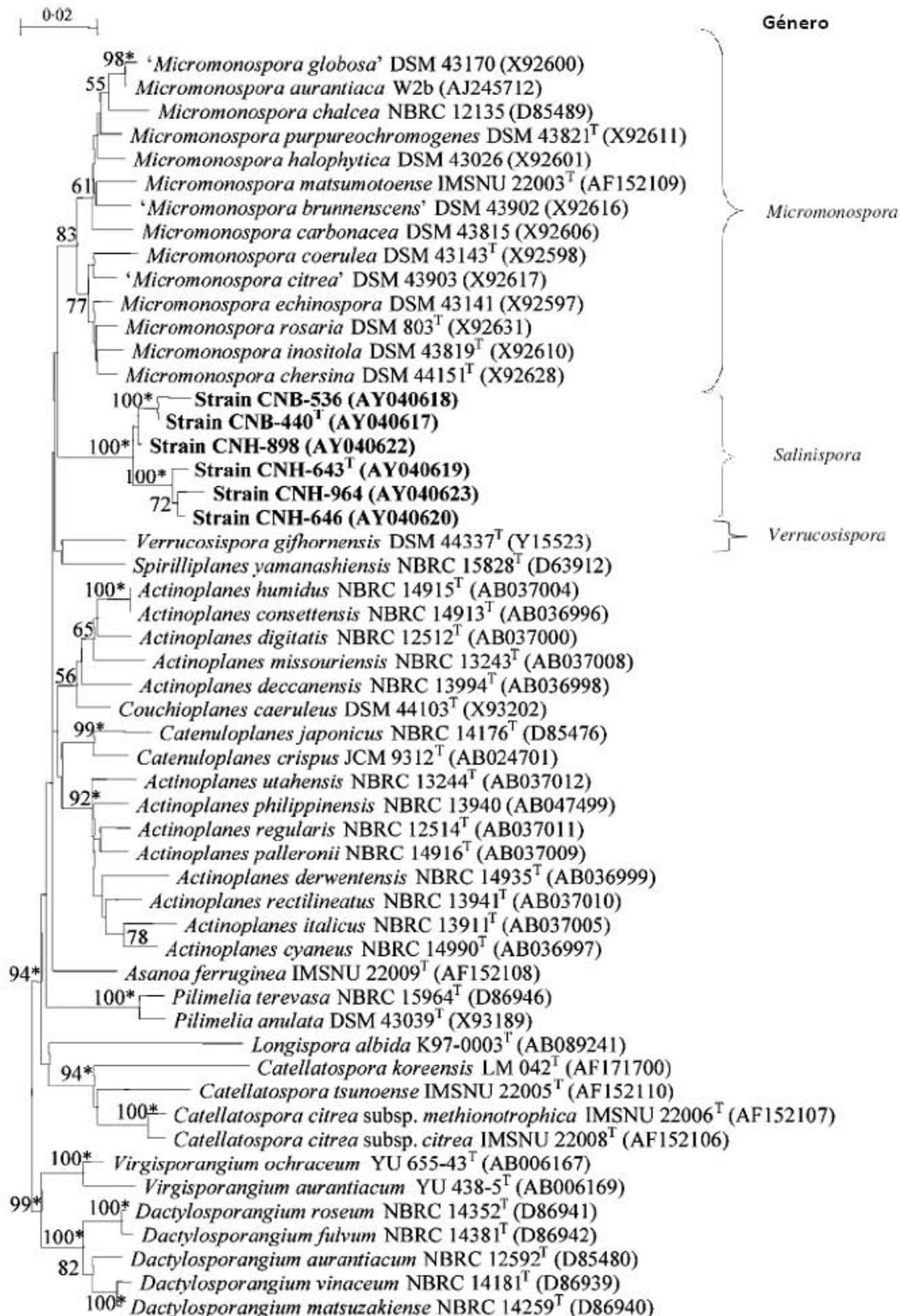


Fig. 1 Árbol filogenético basado en las secuencias del gen 16S rRNA que muestra la relación entre las 6 cepas representativas de **Mar 1** y géneros representativos de la familia *Micromonosporaceae*. Se destaca la proximidad entre los géneros *Micromonospora*, *Salinispora* y *Verrucosipora* [Maldonado et al., 2005a].

Al igual que el género *Micromonospora*, los géneros *Salinispora* y *Verrucosispora* han demostrado producir compuestos bioactivos con potencial terapéutico (Tabla 1). Sin embargo, la identificación de estos microorganismos en nichos marinos, el muestreo, cultivo y aislamiento requieren un análisis previo para su correcta optimización. Por ello, el desarrollo de metodologías que permitan la rápida identificación resulta de gran interés para facilitar la discriminación entre estos grupos taxonómicos. La detección de estos géneros y sus miembros utilizando Reacción en la Cadena de la Polimerasa o PCR (siglas en inglés de: *Polymerase Chain Reaction*) empleando oligos específicos para cada género ha demostrado ser una herramienta de gran relevancia y utilidad en la identificación rápida de diversos grupos microbianos, sin ser la excepción los miembros de la clase *Actinobacteria*. Oligos diseñados específicamente para la amplificación de secuencias presentes en el gen 16S rRNA han sido altamente empleados para géneros raros de actinobacterias [Rintala *et al.*, 2001; Monciardini *et al.*, 2002; Stach *et al.*, 2003; Qiu *et al.*, 2008].

Tabla 1. Compuestos producidos por actinobacterias marinas de la familia *Micromonosporaceae* con potencial uso terapéutico.

Género	Compuesto	Blanco biológico	Potencial terapéutico
<i>Micromonospora</i>	Tiocoralina	DNA polimerasa, citotóxico	Oncológico, enfermedades infecciosas
<i>Micromonospora</i>	Diazepinimicina	Desconocido	Antibacterial, anticancerígeno, antiinflamatorio
<i>Micromonospora</i>	Lomaiviticina	Citotóxico	Oncológico, antimicrobiano
<i>Salinispora</i>	Salinisporamida A	Inhibición de proteosomas	En estudios de fase 1 para tratamiento de tumores, linfoma, mieloma múltiple y células de cáncer de pulmón; antimalaria, Alzheimer.
<i>Salinispora</i>	Esporólido	Desconocido	Posible actividad como anticancerígeno, antibacterial, antimalaria
<i>Verrucosispora</i>	Abisomicina	Ácido p-aminobenzoico	Enfermedades infecciosas, antibacterial
<i>Verrucosispora</i>	Proximicina	Antiproliferativo	Oncológico

[Modificada de Lam, 2006 y Williams, 2008].

Si los grupos de estudio se encuentran demasiado relacionados entre sí, el diseño de este tipo de oligos es un reto pues requiere el estudio de regiones genómicas diferentes al gen 16S rRNA y que muestren suficiente variabilidad. Este es el caso de las regiones localizadas entre los diferentes genes del operón ribosomal (regiones intergénicas) [Zhang *et al.*, 1997].

Igualmente, se han empleado secuencias intergénicas como la 16S-23S rRNA para identificar géneros diferentes aunque son empleados principalmente para diferenciación a nivel de especie [Zhang *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2001].

Estos oligos han sido probados *in silico*¹ y experimentalmente *in vitro*² en diferentes combinaciones (forwards y reversos) para corroborar su especificidad, selectividad y eficiencia así como para validar su uso de forma análoga a los métodos analíticos.

En el presente trabajo se evaluaron *in silico* e *in vitro* la especificidad de diferentes combinaciones de oligos en aislados provenientes de sedimentos marinos del Golfo de California pertenecientes a los géneros *Salinispora* y *Verrucosipora*, que con base en trabajos previos habían sido diseñados *in silico*.

1.2 Objetivos.

General

- ◆ Establecer estrategias de biología molecular con base en PCR para la detección rápida de géneros específicos pertenecientes a la familia *Micromonosporaceae*, proponiendo y evaluando métodos alternativos para la identificación rápida que posteriormente puedan ser aplicados a muestras ambientales como sedimentos marinos.

Particulares

- ◆ Evaluar oligos específicos para la detección del género *Salinispora* por medio de amplificación por PCR.
- ◆ Evaluar oligos específicos para la detección del género *Verrucosipora* por medio de amplificación por PCR.

1.3 Hipótesis.

Los oligos (a) Sal1F, Sal1r y Sal2r, (b) V158-F y V1063-R son específicos *in silico* e *in vitro* para la amplificación e identificación de especies de los géneros *Salinispora* y *Verrucosipora*, respectivamente.

¹ “*In silico*” término utilizado aludiendo al uso de herramientas bioinformáticas, esta palabra hace referencia a los chips de silicón que constituyen los microprocesadores [Loke & Sim, 2006].

² “*In vitro*” vocablo del latín, el término equivale a “en vidrio” que se refiere a la creación de ambientes artificiales como los recreados, por ejemplo, en tubos de ensayo o cajas Petri.

2. MARCO TEÓRICO.

2.1 Importancia de la Microbiología Marina y la Biología Molecular.

El agua es uno de los compuestos más importantes del planeta, principal disolvente y el único compuesto que puede hallarse en cualquiera de los tres estados de agregación de la materia, además de ser un prerrequisito para el desarrollo de la vida y su evolución (Figura 2).



Fig. 2 La Tierra está formada en más del 70% por agua y sólo menos del 30% corresponde a la porción continental [composición elaborada con material de Internet¹].

El planeta está conformado en más de un 70% por océanos, corresponden al 95% de la biósfera y contienen alrededor del 97% del agua del planeta [Gracia-Gasca *et al.*, 2007]. México cuenta con costas al este y al oeste de su territorio, posee una Zona Económica Exclusiva de 200 millas náuticas (370.4 Km), por lo que la porción marina del país resulta ser más extensa que la terrestre [Rosellón-Druker, 2008].

En términos generales, a esta gran extensión y a la complejidad asociada se les puede atribuir lo poco explorados que han sido los océanos. Por esta razón no resulta difícil imaginarlos como una fuente potencialmente rica en recursos microbianos.

La biodiversidad en términos de la vida microbiana está integrada por la relación (papel e interacción) con el ecosistema y los aspectos genéticos, fisiológicos y metabólicos [Rosellón-

¹ De izquierda a derecha, de arriba hacia abajo: <http://estamosenpeligro.blogspot.com/2008/01/2008-ao-internacional-del-planeta.html>, <http://www.dicander.com/pix/files/wave.jpg>, <http://www.energiacomercial.com/inicio/images/stories/oceanos.jpg>, <http://feenelcaos.org/2007/12/the-world>, <http://oceans.greenpeace.org/es/the-expedition/news/la-industria-minera-en-las-isl>, <http://neofronteras.com/?p=114>, <http://fotosubmarina.com/#/page/home/>.

Druker, 2008]. Por esto último la diversidad biológica también puede traducirse en una gran diversidad bioquímica y por lo tanto de metabolitos secundarios con posible interés para el hombre. Así, el descubrimiento y la obtención de nuevos metabolitos secundarios adquiere importancia principalmente para encontrar y desarrollar tratamientos eficaces para enfermedades emergentes que requieren de nuevos principios activos, o bien, para el tratamiento de las cada vez más frecuentes cepas resistentes a los antibióticos utilizados en la terapéutica actual. Esta diversidad bioquímica también da como resultado metabolitos únicos que pueden ameritar un estudio más profundo por sus características propias.

El avance en la investigación en microbiología ambiental ha proporcionado evidencia de la existencia de microorganismos incluso en ambientes considerados hostiles como las chimeneas hidrotermales, sedimentos y en lechos marinos, lagos salados, hielos árticos, entre otros [Weyland, 1969; Jeanthon *et al.*, 2002; Camacho & Fernández-Valiente, 2005; Pathomaree *et al.*, 2006;], donde se esperaría no encontrar ninguna forma de vida (Figura 3). Por ello también resulta fundamental profundizar en el entendimiento de la importancia ecológica de los microorganismos en los ecosistemas.

En ocasiones el medio ambiente marino es considerado hostil principalmente por la salinidad del agua ya que tiene una concentración aproximada de 2.75% de NaCl y entre 3.3 y 3.7% de sales totales [Pelczar *et al.*, 1993]. Adicionalmente este ambiente presenta una disponibilidad limitada de materia orgánica y nutrientes requeridos para el desarrollo de vida. Aunque contienen casi todos los elementos naturales éstos se encuentran en muy bajas concentraciones o como trazas en concentraciones menores a 1 ppm y en algunas ocasiones llegan a encontrarse fuentes de carbono complejas como celulosa o quitina [Atlas & Bartha, 1987; Gracia-Gasca *et al.*, 2007]. A pesar de esto, los microorganismos sobreviven y contribuyen de manera significativa en la manutención de los flujos de energía, en las cadenas tróficas y en los ciclos biogeoquímicos. Es entonces su adaptabilidad metabólica lo que les permite crecer y desarrollarse en esta clase de ecosistemas cumpliendo funciones específicas e importantes.

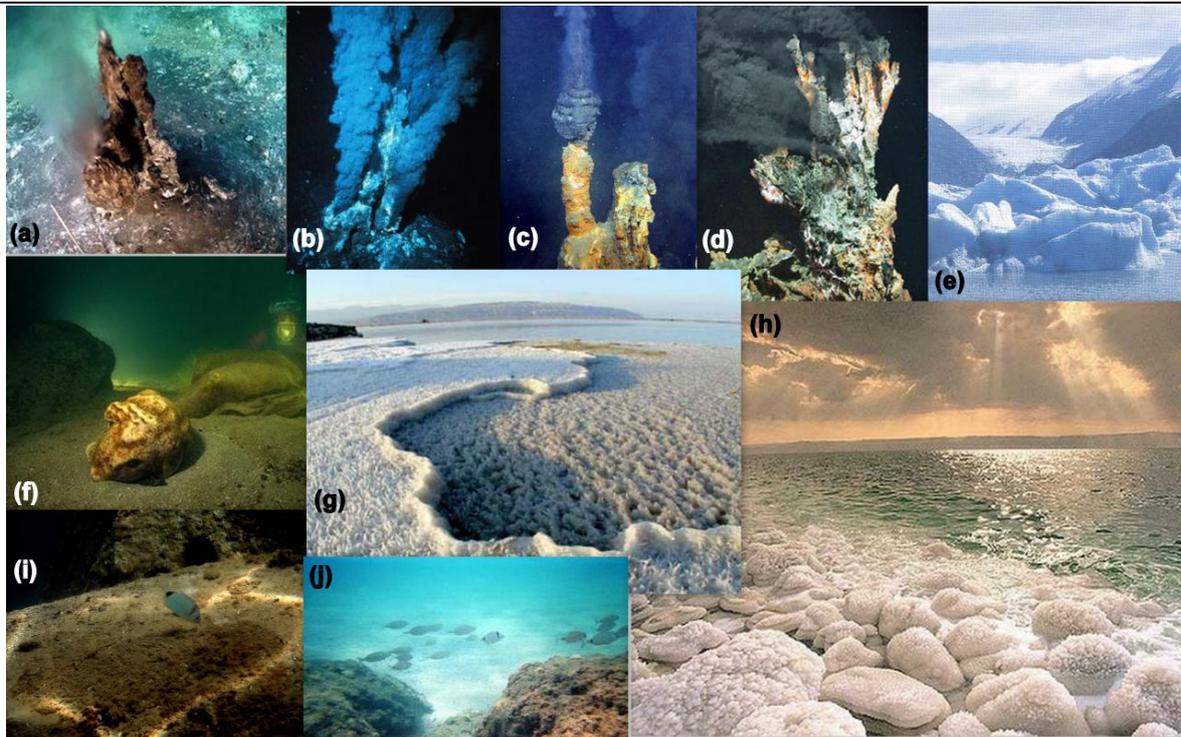


Fig. 3 Ecosistemas hostiles: (a, b, c, d) chimeneas hidrotermales en el fondo marino; (e) océanos y hielos polares; (f, i, j) lechos del fondo marino; (g, h) lagos salados (Mar Muerto) [composición elaborada con imágenes de Internet²].

Esta adaptabilidad también da como resultado la producción de gran variedad de metabolitos secundarios con posible actividad biológica que podrían ser desarrollados como principios activos terapéuticos o que resultan precursores de moléculas potencialmente útiles. Algunos ejemplos son referidos en la Tabla 1 pero adicionalmente se pueden mencionar: (a) el antibiótico SS-228Y producido por *Chainia purpurogena*, primer compuesto bioactivo aislado de actinobacterias marinas, reportado en 1975 por Okazaki y colaboradores; (b) el antimetabólico curacina A utilizado en oncología y (c) el largazol utilizado como antiepiléptico y para el tratamiento de linfoma en las células T cutáneas, o compuestos con aplicaciones agrícolas, industriales u otros usos en biotecnología.

Estas consideraciones hacen que la microbiología marina adquiera gran importancia encaminada, por ejemplo, hacia la *Bioprospección*. Esta área engloba los esfuerzos orientados a la búsqueda, identificación, aislamiento, selección e investigación de compuestos químicos, genes, proteínas, entre otros elementos u organismos útiles o potencialmente útiles

² De izquierda a derecha, de arriba hacia abajo: <http://fotosubmarina.com/#/page/home/>, <http://www.taringa.net/posts/info/1884416/Animales-Asombrosos-%28del-Oceano%29.html>, <http://fotografia-arteyexpresion.blogspot.com/2009/05/fotos-hielos-continentales.html>, <http://profefblog.es/blog/joseluis/files/2007/11/sales-en-el-mar-muerto.jpg>, <http://radiocontempo.files.wordpress.com/2008/11/mar-muerto.jpg>

para el hombre y que proviene de forma natural del medio ambiente [<http://www.ciceana.org.mx/contenido.php?cont=197>; http://www.inbio.ac.cr/es/inbio/inb_prosp.htm].

El valor que adquiere la bioprospección impulsa entonces su desarrollo y el de las ramas de la ciencia asociadas. En nuestra área, la Microbiología, reafirma la importancia de aislar e identificar nuevos microorganismos. Por ello hay que considerar que las técnicas tradicionales de muestreo y las empleadas para recuperar los microorganismos suelen no ser adecuadas para proporcionar información consistente con respecto a la verdadera diversidad de microorganismos que existe en las muestras ambientales, además de presentar varias limitaciones [Amann *et al.*, 1995; Hugenholtz *et al.*, 1998; Sogin *et al.*, 2006]. En la mayoría de los casos y en el laboratorio no siempre se pueden recrear las condiciones del medio natural que permitan una recuperación o aislamiento adecuado de especímenes, creando con ello dificultades para monitorear la diversidad microbiana en los diferentes hábitats acuáticos. Cabe mencionar que datos basados en análisis del gen 16S rRNA sugieren que sólo entre 0.01 y 1% de las bacterias que existen en el medio natural han podido cultivarse en el laboratorio mediante métodos tradicionales [Whitman, 1998].

Para mejorar la capacidad de análisis y monitoreo de las poblaciones microbianas en muestras ambientales (en particular del ecosistema marino) es muy importante desarrollar y aplicar nuevas estrategias que permitan su detección y recuperación para un aislamiento óptimo y la descripción de la diversidad microbiana sin subestimarla. Lo anterior en pro de un mejor entendimiento de las relaciones biológicas en estos hábitats.

Es gracias a las diferentes herramientas de *Biología Molecular* que se ha podido efectuar un mejor escaneo de prácticamente cualquier ecosistema. Éstas han dado una gran aportación al estudio de la diversidad microbiana al haber desarrollado técnicas cultivo independientes que contribuyen con el aislamiento y detección de microorganismos. Estas técnicas se basan principalmente en la extracción, amplificación y análisis de DNA a partir de muestras de suelos, sedimentos marinos, agua, respectivamente [Pelczar *et al.*, 1993; Magarvey *et al.*, 2004; Giovannoni & Stingl, 2005; Maldonado *et al.*, 2005a, b; Kwon *et al.*, 2006; Maldonado *et al.*, 2008].

Adicionalmente, los métodos cultivo independientes han contribuido en demostrar que en los sedimentos marinos se encuentra una amplia variedad de microorganismos únicos que no pueden hallarse en ambientes terrestres [Mincer *et al.*, 2002; Magarvey *et al.*, 2004;

Maldonado *et al.*, 2005a, b; Maldonado *et al.*, 2008]. Igualmente, estas técnicas han guiado de cierto modo los métodos para el aislamiento selectivo de microorganismos cultivables en el laboratorio. El uso de las técnicas cultivo independientes en conjunto con las técnicas clásicas de microbiología han mejorado la detección de microorganismos, la identificación, la apreciación de la diversidad y la elucidación de sus funciones, actividades e interacciones en el ecosistema del cual forman parte e incluso de la identificación de las cepas que no pueden ser cultivadas [Jensen *et al.*, 2005b; Heuer *et al.*, 1997]. Producto de estos avances son las bases de datos de clasificación taxonómica, bibliotecas de cDNA, árboles filogenéticos y bases de datos que contienen secuencias genéticas.

Debe mencionarse que dentro de las técnicas de la biología molecular el PCR es por excelencia de las más utilizadas. Es un método *in vitro* aplicado para la amplificación enzimática de secuencias específicas de DNA con ayuda de oligonucleótidos (oligos) a través de varios ciclos de síntesis. Debido a estos ciclos el número de pasos es altamente repetitivo por lo que se han desarrollado máquinas denominadas termocicladores para controlar los

cambios de temperatura y los tiempos (Figura 4). El DNA obtenido puede ser utilizado para clonación o secuenciación, aplicándolo en el análisis de material genético u otro tipo de análisis.



Fig. 4 Termociclador Techne TC-512 el cual puede ser programado para controlar la temperatura y los tiempos de reacción.

Para que la reacción de PCR pueda llevarse a cabo se requieren de componentes indispensables, así como de pasos básicos que componen un ciclo de amplificación. Estos pasos son 3 (Figura 5).

- I. Desnaturalización. Cuya temperatura va de 94 a 96° C. Una muestra de DNA agregado en exceso es desnaturalizado a altas temperaturas, es decir, se permite la apertura de la doble hélice. Este DNA sirve de molde para la amplificación de una determinada secuencia.
- II. Alineamiento o hibridación. La temperatura puede ser de 30 a 70° C y depende de los oligos utilizados. Éstos corresponden a una determinada secuencia de 15 a 20 bases [Koolman & Röhm, 2004] las cuales representan las bases complementarias al sitio de

Un ciclo toma alrededor de 1 o 2 minutos para llevarse a cabo [Madigan *et al.*, 2004], después del tercer ciclo se forman cadenas dobles cuya longitud corresponde a la del iniciador y su proporción se incrementa cerca del doble con cada ciclo hasta que casi todos los segmentos sintetizados alcanzan la longitud deseada, así, la secuencia de DNA se amplifica $>10^6$ veces [Koolman & Röhm, 2004; Madigan *et al.*, 2004].

Cabe destacar que en ocasiones y previo al primer paso de desnaturalización, se adiciona un paso único denominado *desnaturalización inicial* y al término del PCR un último y único paso denominado *extensión final*. El objetivo de ambos es optimizar los productos amplificados en el PCR.

Es importante destacar que el PCR depende de tres factores: (a) concentración de los reactivos y el DNA molde, (b) temperaturas utilizadas en los pasos que componen un ciclo de amplificación y (c) tiempo de duración de cada paso del ciclo [Stenesh, 1989].

Igualmente, esta técnica requiere el conocimiento de la secuencia de nucleótidos del segmento que se desea amplificar ya que es indispensable contar con oligos iniciadores que hibriden cada una de las cadenas a ambos lados del segmento de DNA blanco. Esta es la razón de que deban ser complementarios a las secuencias presentes en la región genómica de interés.

De esta manera, el advenimiento de la biología molecular ha revolucionado prácticamente cualquier aspecto de la microbiología moderna. Muchas de las investigaciones en la actualidad se enfocan en utilizar técnicas con el fin de amplificar secuencias genéticas del DNA total extraído de muestras ambientales usando PCR seguido de clonación y análisis de las secuencias obtenidas. Esto permite la identificación y clasificación bacteriana y la reconstrucción de las relaciones filogenéticas [Woese, 1987; Head, 2004], por ejemplo.

2.2 Empleo de oligos específicos para la identificación bacteriana.

2.2.1 Gen 16S rRNA.

Para determinar las relaciones evolutivas entre organismos (relaciones filogenéticas) es importante utilizar macromoléculas reconocidas como cronómetros evolutivos (medidas del cambio evolutivo). Estas moléculas se deben escoger no sólo porque están universalmente

distribuidas sino que deben además ser funcionalmente homólogas en cada organismo. Algunas de estas macromoléculas son citocromos, proteínas de hierro, genes de otras proteínas y los RNAs ribosómicos, de los cuales éstos últimos son los más ampliamente utilizados [Madigan, & Martinko, 2006].

Para el estudio de bacterias y arqueas se recurre a la secuencia de la subunidad 16S rRNA porque reúne ciertas características favorables como: (a) ser componentes cruciales de los ribosomas, (b) poseer una función común en todas las células (elementos integrales del aparato de biosíntesis de proteínas) y (c) su estructura primaria es un mosaico de secuencias conservadas y variables que permite el alineamiento de posiciones homólogas y la identificación de secuencias conservadas universalmente (motivos conservados). Igualmente hay poca evidencia de transferencia horizontal de genes de rRNA, así mismo, existen bases de datos muy completas de secuencias de rRNA de modo que se cuenta con bibliotecas para efectuar comparaciones o identificar nuevas secuencias.

En el caso de las bacterias se emplea principalmente la subunidad 16S ya que presenta un tamaño adecuado, con 1 543 bases o nucleótidos y proporciona una buena resolución en el análisis filogenético. La subunidad 23S es considerada demasiado grande al contar con 3 300 bases y la 5S pequeña ya que sólo cuenta con 120 nucleótidos y no proporciona ningún tipo de resolución filogenética [Head, 2004].

El operón del RNA ribosomal (Figura 6) se encuentra conformado de la siguiente manera (5'→3'): rRNA 16S, espacio de región, rRNA 23S, espacio de región y rRNA 5S.

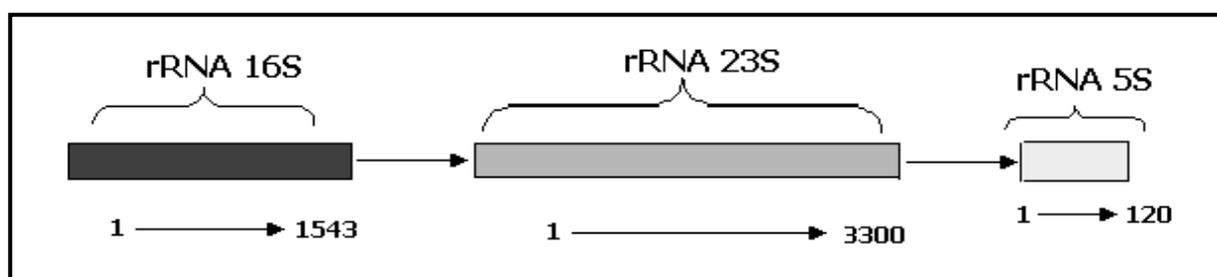


Fig. 6 Operón del rRNA. Los rectángulos indican los genes del operón, las flechas indican la transcripción del mismo, que va de izquierda a derecha y los números en la parte inferior indican el tamaño aproximado de cada subunidad dado en número de bases [Maldonado, 2002].

Aunque la secuencia del gen 16S rRNA es ampliamente utilizada, ocurre que en ocasiones la diferenciación entre dos grupos taxonómicos no puede realizarse correctamente debido a lo altamente conservada que puede estar esta secuencia entre organismos estrechamente

relacionados. En algunos casos se recurre a secuencias de regiones de DNA que pueden ser menos conservadas que ésta [Zhang *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2001]. Estas secuencias pueden ser aquellas que corresponden a regiones espaciadoras o regiones intergénicas.

2.2.2 Diseño y aplicación de oligos específicos para la identificación bacteriana.

Como se mencionó previamente, para efectuar la amplificación por PCR se debe conocer la secuencia de nucleótidos del segmento al cual va dirigida la amplificación para diseñar o utilizar los oligos complementarios a la región de interés (al inicio y al término del copiado). Así, un juego o par de oligos consiste en un forward y un reverso, uno que va en dirección 5'→3' y otro que corresponde al sentido 3'→5' respectivamente. Se da entonces el uso de oligos dirigidos a regiones del rRNA que se sabe son específicas del organismo de interés, facilitando así una detección cualitativa y en técnicas de PCR especializadas también cuantitativa.

La secuencia blanco puede tratarse de una región conservada, como las regiones de diagnóstico filogenético de correlación entre grupos o familias, o una región variable para que sea más específico ya sea para diferenciar familias, géneros o especies, todo ello dependiendo del enfoque que se desee dar al análisis del DNA amplificado [Heuer *et al.*, 1997; Monciardini *et al.*, 2002].

Existen oligos considerados como universales y prácticamente pueden amplificar cualquier clase u orden específico: el par de oligos F27 y R1492 es universal para el dominio *Bacteria*. Los oligos S-C-Act-235-a-S-20 o el S-C-Act-878-a-A-19 son universales para la clase *Actinobacteria* mostrando especificidad para el 82% de los géneros de esta clase [Stach *et al.*, 2003]; algunos juegos de oligos específicos para familias son: M2F-A3R y 21F-959R para la familia *Micromonosporaceae* y para la familia *Streptomyetaceae* respectivamente [Monciardini *et al.*, 2002]. El par de oligos M558F y C1028R es género-específicos para *Micromonospora* [Qiu *et al.*, 2008]. Todos estos son ejemplos de oligos que van dirigidos al gen 16S rRNA. Cabe señalar que este tipo de oligos ayudan a detectar poblaciones de grupos taxonómicos específicos en diferentes tipos de muestras ambientales y permiten incluso la identificación de aislados que no han sido descritos.

La meta del diseño de oligos es desarrollar un par de éstos que efectivamente hibriden al DNA molde predeterminado permitiendo alcanzar la amplificación deseada. Oligos bien diseñados aumentan la eficiencia y rendimiento de la reacción aunque se debe contar con la posibilidad de que a pesar de estar bien diseñado no presente la respuesta esperada. Los oligos deben ser de alrededor de 15 a 20 bases de largo [Koolman & Röhm, 2004], deben poseer extremos 3' no complementarios para evitar la formación de dímeros, una temperatura media de alineamiento entre 55 a 65° C y deben tener entre 40 a 60% de G+C [Head, 2004].

La respuesta favorable de los oligos estará definida por dos factores: (1) especificidad, para obtener la mínima hibridación de DNA que no es molde y (2) cobertura, por ejemplo, cuántos miembros de la clase o del género responden amplificando el fragmento que se espera. Estas características dependen de la calidad y cantidad de secuencias utilizadas para el diseño de los oligos [Stach *et al.*, 2003].

En términos prácticos, el aislamiento de DNA debe tener calidad tal que permita su uso en procedimientos particulares como es el caso del PCR que requiere DNA de alta pureza en comparación con otras técnicas como el análisis con endonucleasas o enzimas de restricción³ donde el DNA no requiere tal grado de pureza. De manera que para optimizar la calidad del análisis subsecuente se deben tener ciertas consideraciones como el maximizar la lisis celular y recuperación de DNA [Bruce *et al.*, 1999]. Igualmente, el uso de oligos de baja calidad es frecuentemente causa de error.

Estos estudios se han desarrollado rápidamente gracias a la disponibilidad de secuenciadores automatizados que reducen los tiempos de proceso permitiendo un análisis óptimo. Además, la sensibilidad del método permite detectar incluso bacterias presentes en muy bajas concentraciones en muestras ambientales. Así también, la comparación de secuencias recuperadas del medio ambiente junto con el aislamiento por cultivo permiten establecer relaciones filogenéticas contribuyendo a un mejor estudio.

Cabe destacar que para poder efectuar los análisis correspondientes de las secuencias del gen 16S rRNA de los miembros de los géneros o especies para los cuales van dirigidos los oligos se emplean las herramientas bioinformáticas. Por medio de aplicaciones como el

³ Enzimas de restricción son enzimas que reconocen sitios específicos del DNA escindiendo y generando fragmentos con pesos moleculares bien definidos.

BLAST⁴ (proporcionado por el servidor del NCBI⁵), que permiten el alineamiento de varias secuencias de DNA para localizar secuencias iguales o diferentes en los miembros de una familia, un género o en cepas de una misma especie. Igualmente, permiten identificar si los oligos se corresponden con secuencias presentes en los microorganismos que se busca identificar (la evaluación *in silico*). Igualmente, es importante señalar que en Internet se dispone de software que permiten el diseño de oligos, caracterización, condiciones óptimas teóricas para PCR, etc. Todas estas herramientas son producto de la Bioinformática que han surgido con el progreso de la ciencia y la necesidad del acceso y el uso de gran cantidad de información.

2.3 Bioinformática, herramienta clave para la Biología Molecular.

Algunas décadas atrás sólo se disponía de dos modalidades para efectuar experimentos biológicos: (1) *in vivo*, es decir, en organismos vivos o (2) *in vitro* o experimentalmente [Loke & Sim, 2006].

En la actualidad el avance y el desarrollo de la ciencia, especialmente hablando de la biología y de la biología molecular, así como su aplicación en diferentes áreas han llevado a la generación de gran cantidad de información muy diversa. Se han creado bases de datos de secuencias genéticas de humanos y de otros organismos, de proteínas, interacciones proteína-proteína, árboles filogenéticos, material bibliográfico, etc. El problema asociado a esto es el acceso a la información que particularmente se requiere, el manejo adecuado de ella y su manipulación con fines de consulta, de investigación y como apoyo de la misma.

Para poder dar solución a este problema y a los que son consecuencia de este mismo se ha dado el surgimiento de una nueva especialidad: la *Bioinformática* [Weaver, 2008] que puede ser considerada como Biología *in silico* y que es la tercer modalidad para efectuar experimentos biológicos [Loke & Sim, 2006], por ejemplo, por medio de simuladores.

La bioinformática, aludiendo intuitivamente a la Tecnología de la Información Biológica, comprende conocimientos biológicos, de informática y tecnología para el procesamiento de datos y el desarrollo de programas computacionales. De esta manera, se puede integrar-

⁴ BLAST siglas en inglés de: *Basic Local Alignment Search Tool* o Herramienta Básica de Búsqueda de Alineamiento Local.

⁵ NCBI siglas en inglés de: *National Center for Biotechnology Information* o Centro Nacional para Información Biotecnológica.

manipular-manejar la información recolectada durante estudios genómicos y en general durante el desarrollo de la investigación científica y para la digitalización de la información nueva que se obtiene. La bioinformática involucra, por lo tanto, el desarrollo de bases de datos y herramientas para la manipulación de información así como el uso de estos recursos [Loke & Sim, 2006; Weaver, 2008]. Así, esta disciplina se desarrolla a la par de la biología molecular para un mejor entendimiento de la organización celular [Buehler & Rashidi, 2005].

Considerando que para la bioinformática las secuencias de genes y la secuencia y estructura de proteínas son fundamentales, básicamente se puede señalar que existen dos tipos principales de bases de datos [Loke & Sim, 2006]:

(1) Bases de datos que incluyen secuencias de DNA y proteínas de todos los organismos (Tabla 2) y que permiten encontrar secuencias de genes, genomas completos, trabajar con secuencias o genomas de diferentes organismos.

(2) Bases de datos especializadas que corresponden a un determinado organismo y que resultan de utilidad para hallar información como mapas genéticos, genes, secuencias de DNA artículos de investigación, etc., relacionados.

Los principales servidores bioinformáticos de dominio público son: NCBI, EBI (siglas en inglés de: *European Bioinformatics Institute* o Instituto Europeo de Bioinformática, cuya sede radica en Inglaterra) y el GenomeNet cuyo soporte son La Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, KEGG) y el DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*) también de Japón. Los tres servidores cuentan con bases de datos y diversas herramientas de análisis [Buehler & Rashidi, 2005].

Tabla 2. Recursos de Bioinformática de libre acceso en Internet.

Base de datos	Recurso	Página de Internet
DNA	GenBank ⁶	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
	EMBL	http://www.ebi.ac.uk/embl/
Proteínas	Swissprot	http://www.ebi.ac.uk/swissprot/
	Brenda	http://www.brenda-enzymes.org/

⁶ Base de datos elaborada a modo de biblioteca de genomas, creada en consorcio por el Centro Nacional de Información Biotecnológica o **NCBI** de EE.UU., el Laboratorio de Biología Molecular Europeo o **EMBL** (*European Molecular Biology Laboratory*) y el Banco de Datos de DNA de Japón o **DDBJ** (*DNA Data Bank of Japan*).

El Instituto de Investigaciones Genómicas de Estados Unidos, TIGR por sus siglas en inglés (*Institute for Genomic Research*), tiene una página de internet que permite el análisis estructural, funcional y comparativo del genoma y de productos de genes de virus, bacterias, archeas y eucariotes (plantas y animales), incluyendo también el genoma humano. Este sitio web, al ser creado a partir de publicaciones del mismo Instituto, es de libre acceso y de dominio público [<http://www.tigr.org/tdb>].

Siendo de gran relevancia los servicios que facilita el NCBI al usuario se pueden mencionar las principales herramientas que proporciona y que pueden tener equivalencia con herramientas disponibles en otros servidores:

- I. *PubMed* (Public MEDLINE). Es un servicio de búsqueda de la Biblioteca Nacional de Medicina de EE.UU., permite acceder a citas de Revistas Científicas (Journals) y a bases de datos que contribuyen al acceso a la información bibliográfica rápidamente.
- II. *BLAST*. Es un programa que busca en una base de datos de secuencias de DNA o de proteínas similares u homólogas a la secuencia de interés (la secuencia sujeta a estudio), proporciona el nombre del organismo que presenta la secuencia similar y muestra una alineación entre 2 o más secuencias para que puedan ser comparadas.
- III. *Entrez*. Permite la búsqueda y el acceso a bases de datos, citas bibliográficas mediante referencias cruzadas con la información básica de interés.
- IV. *BankIt* es una aplicación que permite al usuario agregar nuevas secuencias al GenBank que ha obtenido como producto de la investigación para que el equipo del NCBI lo evalúe y le proporcione un número de ascensión o acceso, es decir, una clave alfanumérica única que queda registrada en varias bases de datos y que permita su identificación para posteriores consultas.
- V. *OMIM* (*Online Mendelian Inheritance in Man*⁷). Se trata de una base de datos de genes y de desórdenes genéticos en el humano.
- VI. *Taxonomy*. Esta aplicación contiene bases de datos de organismos (por nombre científico y nombre común) para los cuales se conoce parcial o totalmente su genoma y

⁷ Mendelian Inheritance in Man o Herencia Mendeliana en el Hombre.

permite el acceso a información genética, identificación de relación o la falta de ésta entre especies (los árboles filogenéticos son la representación gráfica de estas relaciones), su organización taxonómica, etc.

- VII. *Structure*. Contiene el llamado *Molecular Modeling Database* o Base de Datos de Modelaje Molecular (MMDB por sus siglas en inglés). Igualmente, contiene una gran variedad de software que resultan de utilidad para el análisis estructural de proteínas.

2.4 La clase *Actinobacteria*.

La clase *Actinobacteria* es un grupo heterogéneo de bacterias Gram positivas con un elevado contenido de G+C, entre 60 y 77% y está conformada por 34 familias taxonómicas [Madigan, & Martinko, 2006; Stackebrandt *et al.*, 1997].

Se dice que son un grupo heterogéneo de bacterias ya que los miembros de este grupo suelen presentar una amplia variedad morfológica microscópicamente. Predomina la forma de bacilos con desarrollo filamentoso debido a la presencia de hifas aéreas [Delgado *et al.*, 1994]. Sin embargo, también pueden presentar morfología microscópica cocobacilar o difteroide ya que en algunos géneros de actinobacterias los filamentos se segmentan con gran facilidad durante el crecimiento y dan lugar a células pleomórficas [Davis *et al.*, 1996]. Macroscópicamente algunos miembros presentan morfología colonial similar a colonias bacterianas pero con consistencia particularmente dura o rugosa (Figura 7b, d).

Las actinobacterias suelen recibir el nombre genérico de Actinomicetos, lo cual históricamente se explica considerando que la primera observación al microscopio de tejido infectado con estos microorganismos dio como resultado la apreciación de elementos dispuestos radialmente. Por ello se les adjudicó el prefijo proveniente de la palabra griega *aktino-* “rayo” y del griego *-mykes* “hongo” ya que macroscópicamente algunas de estas bacterias tienen semejanza con el desarrollo micelial de hongos filamentosos. Sin embargo, poseen varias diferencias significativas siendo más representativo el hecho de que los hongos poseen pared celular de quitina y las bacterias no [Davis *et al.*, 1996]. Pese a su diversidad morfológica, la secuencia del gen 16S rRNA sugiere que son un grupo filogenético coherente y forman una línea distintiva en el árbol filogenético basado en este gen [Madigan, & Martinko, 2006].

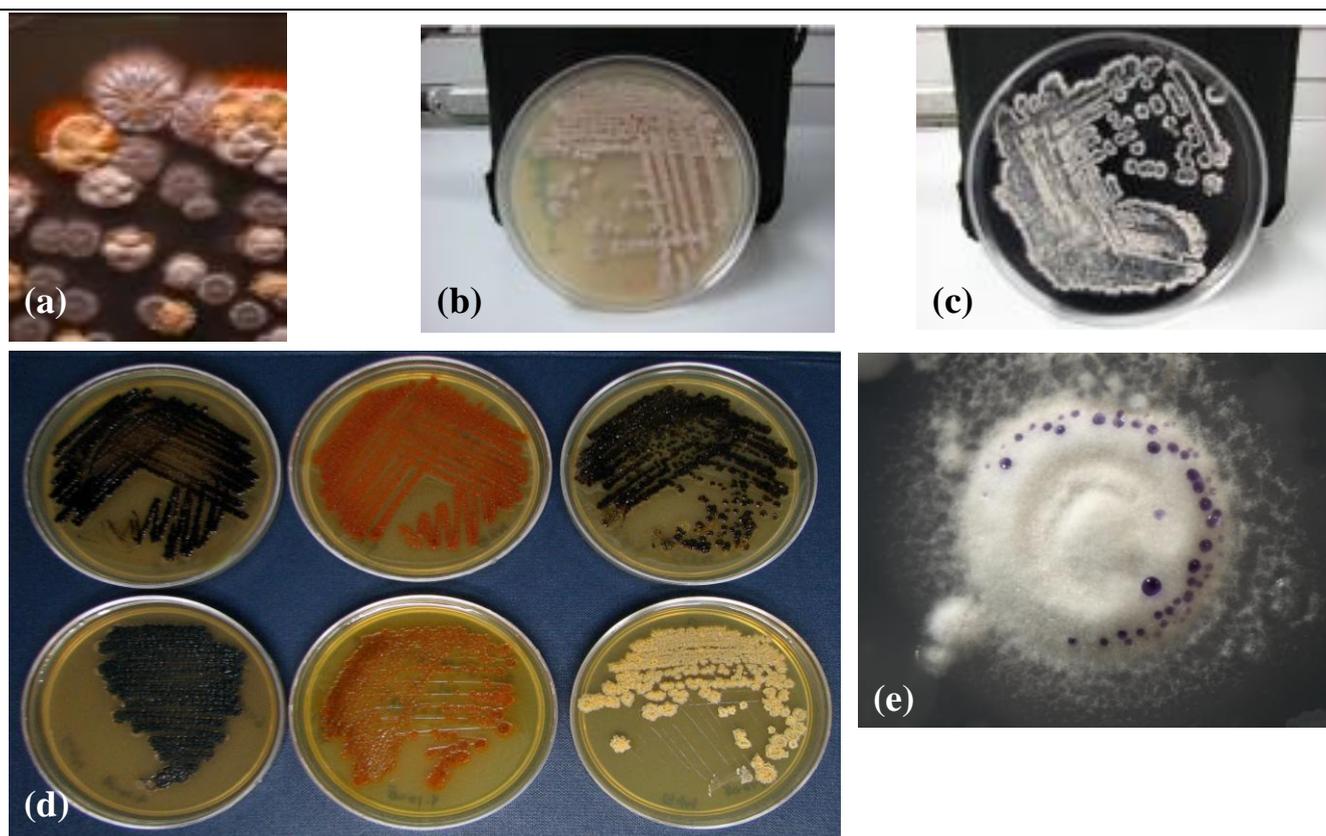


Fig. 7 Morfología macroscópica. Miembros del género *Streptomyces*: (a) morfología filamentosa típica, aislados de actinobacterias marinas mexicanas. En (b) agar extracto de malta (GYM) y (c) glucosa extracto de levadura (GYEA) [Rosellón-Druker, 2008]; (d) Diferentes miembros de la familia *Micromonosporaceae* mostrando diferentes estadios de cultivo, (e) *Streptomyces* sp. con producción de metabolitos sobre el micelio aéreo [Maldonado & Quintana, sin publicar; Fragoso-Yáñez, 2009].

Cabe destacar que también se recurre a nombrar a las actinobacterias como actinomicetos ya que el orden estudiado corresponde al orden *Actinomycetales*, el cual se encuentra dentro de la clase *Actinobacteria* y comprende 30 familias y cerca de 233 géneros [Stackebrandt *et al.*, 1997; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>].

Pueden hallarse en una gran diversidad de hábitats tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos, siendo recurrentes en suelos y en la vegetación. En su mayoría se consideran comensales inocuos pero algunos resultan patógenos para las plantas, los animales y el humano [Delgado *et al.*, 1994].

En el hombre pueden causar infección por:

(a) Inhalación de esporas. Algunas especies del género *Streptomyces* han sido asociadas a enfermedades pulmonares en granjeros al inhalar heno o paja contaminada [Lacey & Crook, 1988]. *Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico de la tuberculosis cuyo contagio también

se da vía respiratoria. Ciertas especies del género *Nocardia* pueden también producir nocardiosis o pseudotuberculosis, una enfermedad oportunista que afecta primordialmente pulmones y que puede diseminarse a otros órganos y al Sistema Nervioso Central [Bonifaz, 2000]. Un ejemplo es *N. africana*, detectada en pacientes con infección pulmonar crónica que no responden ante el tratamiento para la tuberculosis o después de responder presentan recaída [Hamid *et al.*, 2001].

b) Contacto directo de una herida o traumatismo abierto al entrar esporas de algunos actinomicetos. Varios géneros producen micetoma⁸ (actinomicetoma) a través de esta vía, algunas especies vinculadas con este padecimiento son: *Nocardia brasiliensis*, *N. asteroides*, *N. otitidiscaviarum*, *Actinomadura madurae*, *A. pelletieri*, *A. latina* [Trujillo & Goodfellow, 1997], *Streptomyces somaliensis*, *S. paraguayensis* [Bonifaz, 2000], y *S. sudanensis* [Quintana *et al.*, 2007].

Actinobacterias del género *Rhodococcus* se han asociado a infecciones en heridas abiertas, abscesos, infecciones pulmonares y osteomielitis [Delgado *et al.*, 1994]. *M. leprae* agente etiológico de la lepra se puede adquirir por inhalación o a través de escoriaciones en la piel.

De esta manera, las actinobacterias también pueden ser aisladas de muestras clínicas como raspado orofaríngeo, de piel o tracto gastrointestinal [Delgado *et al.*, 1994]. Por lo que tanto en la práctica clínica así como en la investigación para su identificación se suele recurrir a su descripción morfológica micro (utilizando diferentes técnicas de tinción) y macroscópica (en medios de cultivo determinados), pruebas bioquímicas e incluso pruebas que incluyen técnicas de biología molecular [Rheims *et al.*, 1998; Hamid *et al.*, 2001; Mincer *et al.*, 2002; Gobernado & López-Hontangas, 2003; Maldonado *et al.*, 2005a, b; Lam, 2006; Madigan & Martinko, 2006; Jensen *et al.*, 2007].

En contraste a su relevancia clínica algunas actinobacterias poseen gran importancia económica para la medicina y la biotecnología. Y en términos de ecología también poseen un papel destacado ya que dentro de los ecosistemas y gracias a su excepcional actividad metabólica participan en el ciclaje de nutrientes, en los ciclos biogeoquímicos, en la manutención de los flujos de energía y en la degradación de material orgánico. Llegan a

⁸ Síndrome inflamatorio crónico, destructivo y progresivo, caracterizado por aumento del volumen y por deformación de la zona afectada con presencia de lesiones nodulares.

degradar biopolímeros recalcitrantes como celulosa, lignina, pectina, quitina e incluso contribuyen en la degradación de desechos agrícolas, urbanos y xenobóticos [McCarthy, 1987]. Esto último despierta el interés de explorar su uso en biorremediación y su aplicación en la industria agrícola.

Con el avance de la microbiología marina se han identificado miembros de este grupo taxonómico en los océanos [Weyland, 1969; Mincer *et al.*, 2002; Maldonado *et al.*, 2005a, b] mostrándose también evidencia importante de una completa adaptabilidad a éstos [Moran *et al.*, 1995; Mincer *et al.*, 2002]. Se han identificando incluso especies endémicas [Helmke & Weyland, 1984; Han *et al.*, 2003] y marino obligadas (su crecimiento depende de la presencia de sal en el medio de cultivo, particularmente de sodio) [Mincer *et al.*, 2002; Maldonado *et al.*, 2005a], con lo cual se ha logrado apreciar que las actinobacterias no sólo están presentes en los suelos y demostrar que las esporas no son arrastradas por corrientes de agua y depositadas en el mar como solía creerse.

Hace algunos años, se consideraba que existía poca variedad de actinobacterias en los océanos, reportándose únicamente los géneros *Micromonospora*, *Rhodococcus* y *Streptomyces* [Weyland, 1969; Goodfellow & Haynes, 1984]. En reportes más recientes se ha descrito una mayor diversidad de bacterias pertenecientes a esta clase, por ejemplo, los géneros: *Actinomadura*, *Nonomuraea*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Salinispora*, '*Solwaraspora*' y *Verrucosispora* han sido aislados de muestras del Golfo de California y además se han detectado miembros de los géneros *Dietzia*, *Gordonia* y *Rhodococcus* en el Golfo de México [Maldonado *et al.*, 2008]. Estos y otros géneros como *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardiopsis*, *Nonomuraea*, *Pseudonocardia*, *Streptosporangium* y *Williamsia* se han reportado también en otras zonas geográficas así como en aguas mexicanas [Maldonado *et al.*, 2005b].

Gracias al análisis del gen 16S rRNA se han identificado nuevos géneros como: *Salinispora* [Maldonado *et al.*, 2005a], '*Solwaraspora*' [Magarvey *et al.*, 2004], '*Marinispora*' [Kwon *et al.*, 2006] y '*Lamerjespora*' [Fortman *et al.*, 2005] en muestras de sedimentos marinos. Se han aislado también actinobacterias de sedimentos obtenidos a una profundidad de más de 10 000 metros en las Fosas de las Marianas [Pathom-aree *et al.*, 2006]; actinobacterias asociadas a coral o a plancton (bacterioplancton) [Giovannoni & Stingl, 2005] y en simbiosis con esponjas y algas [Jensen *et al.*, 2005b].

Su potencial en la biotecnología está determinado por la gran actividad bioquímica que poseen y está asociada al ambiente donde se pueden encontrar. Lo anterior da como resultado la producción de metabolitos secundarios complejos y que pueden ser bioactivos y por lo tanto de interés para el hombre. En muchos casos no pueden ser obtenidos de cepas terrestres y son difíciles de reproducir sintéticamente en el laboratorio debido a la complejidad de las moléculas. Sólo considerando actinobacterias miembros del orden *Actinomycetales* se cuentan cerca de 10 000 productos naturales. Resultan por tanto una fuente potencial indiscutible para descubrir nuevos productos naturales relevantes que pueden emplearse para el desarrollo de agentes terapéuticos. Por ejemplo: antitumorales y antibióticos [Kwon *et al.*, 2007] y de creciente interés en la actualidad: antivirales, antiinflamatorios, inmunomoduladores, enzimas, inhibidores de enzimas [Fenical & Jensen, 2006; Lam, 2006; Bull & Stach, 2007; Williams, 2008], tratamientos contra la malaria [Prudhomme *et al.*, 2008], Destacan principalmente los hallazgos en el descubrimiento de novedosos metabolitos secundarios producidos por miembros de la familia *Micromonosporaceae*.

2.4.1 La familia *Micromonosporaceae* y su importancia.

El orden Actinomycetales contiene al suborden *Micromonosporineae* al cual pertenece la familia *Micromonosporaceae* [Stackebrandt *et al.*, 1997]. Esta familia es filogenéticamente distintiva aunque engloba una gran diversidad quimiotaxonómica y morfológica de organismos filamentosos que pertenecen a 19 géneros: *Actinocatenispora*, *Actinoplanes*, *Asanoa*, *Catellatospora*, *Catenuloplanes*, *Couchioplanes*, *Dactylosporangium*, *Krasilnikovia*, *Longispora*, *Luedemannella*, *Micromonospora*, *Pilimelia*, *Polymotphospora*, *Pseudosporangium*, *Salinispora*, '*Solwaraspora*', *Spirilliplanes*, *Verrucosispora* y *Virgisporangium* [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=28056>]. Su diferenciación con respecto a otras actinobacterias y su reconocimiento como parte de la familia es determinado por el análisis del gen 16S rRNA así como por la presencia de patrones específicos de nucleótidos en este gen (firma de nucleótidos o nucleótidos-signature⁹).

Dentro de esta familia destacan tres géneros que han sido recuperados de muestras marinas y además son productores de metabolitos secundarios relevantes para el hombre, algunos de los cuales resultan ser nuevos y no poseen equivalentes terrestres. Éstos son:

⁹ Nucleótidos-signature (signature nucleotides) secuencia o secuencias de nucleótidos dentro del gen 16S rRNA específicos que pueden ser recurrentes en un género o en una especie representando una “huella digital” o “firma”.

Micromonospora, *Salinispora* y *Verrucosispora* y han sido mayormente reportados en el aislamiento de metabolitos secundarios con potencial aplicación como agentes terapéuticos. Algunos metabolitos secundarios producidos por estos géneros se encuentran enlistados en la Tabla 1 e ilustrados en la Figura 8.

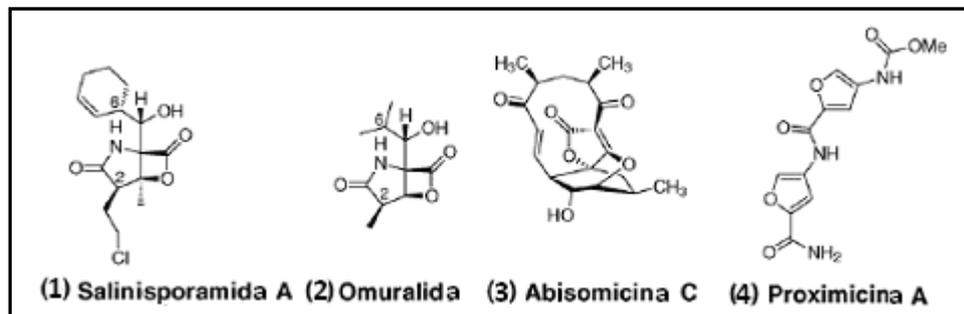


Fig. 8 Metabolitos secundarios con actividad biológica producidos por actinobacterias. (1) Salinisporamida A, posee una potencia mucho mayor que la (2) Omuralida producida por actinobacterias terrestres. (3) Abisomicina C y (4) la Proximicina A son producidos por una cepa del género *Verrucosispora* [modificado de Williams, 2008].

2.4.1.1 El género *Salinispora*.

La primera evidencia relevante sobre la persistencia y la distribución de actinobacterias endémicas del medio ambiente marino fue proporcionada por el trabajo de Mincer y colaboradores en 2002 al aislar un gran número de microorganismos los cuales fueron designados como “**Mar 1**”.

La identificación de los “**Mar 1**” se efectuó a partir de sus características morfológicas, nucléotidos-signature del gen 16S rRNA y por un requerimiento obligado de agua marina para su crecimiento [Mincer *et al.*, 2002; Maldonado *et al.*, 2005a]. Adicionalmente, el análisis de las secuencias del gen 16S rRNA de seis de estos microorganismos demostró consistencia con su designación como grupo filogenético dentro de la familia *Micromonosporaceae*, un género nuevo al cual se le dio el nombre provisional de ‘*Salinospora*’ (sic) [Mincer *et al.*, 2002]. En el árbol filogenético de la Figura 1, construido a partir del análisis de secuencias del gen 16S rRNA, se puede apreciar la posición del género *Salinispora* con respecto a otros miembros de esta familia.

Estudios moleculares posteriores a su descubrimiento permitieron la descripción formal de este género para el cual se propuso el epíteto *Salinispora*, género del cual también se efectuó la descripción de dos especies: *Salinispora arenicola* y *S. tropica* [Maldonado *et al.*, 2005a] y a

la fecha se cuenta con una tercer especie propuesta como: '*S. pacifica*' [Jensen & Mafnas, 2006]. Cabe destacar que las tres especies están altamente relacionadas (en términos filogenéticos). Por ejemplo, *S. tropica* y *S. arenicola* comparten el 99.53 % de similitud de su secuencia del gen 16S rRNA que equivale a una diferencia de 7 nucleótidos [Jensen & Mafnas, 2006], lo que sugiere poca diversidad filogenética entre miembros de este género.

Como parte del trabajo de Mincer y colaboradores (2002) y a partir de trabajos derivados del mismo, se han reportado aislamientos de actinobacterias de este género en sedimentos marinos del Mar Rojo, del Mar de Cortés, las Bahamas, de las Islas de Guam, del Mar Caribe (Islas Vírgenes de Estados Unidos) [Mincer *et al.*, 2002; Jensen *et al.*, 2005b; Jensen & Mafnas, 2006], Palau [Jensen & Mafnas, 2006; Gontang *et al.*, 2007], el Golfo de California [Maldonado *et al.*, 2008] y también recuperados de invertebrados de la Gran Barrera de Arrecifes en Australia [Kim *et al.*, 2005] y Fiji [He *et al.*, 2001]. Sin embargo, se ha fallado en los intentos de aislar este género de zonas templadas como el Océano Pacífico cerca de La Jolla, California y de sedimentos recolectados en Alaska. Esta evidencia sugiere que su distribución está limitada por la latitud [Jensen *et al.*, 2005b] y su aislamiento a zonas tropicales y subtropicales¹⁰ lo que se domina *distribución pantropical*.

Del estudio de la distribución geográfica de las especies de este género [Jensen & Mafnas, 2006] se ha observado que *S. arenicola* posee una amplia distribución en los sedimentos de zonas tropicales y subtropicales, recuperándose de los sedimentos obtenidos de seis de las regiones geográficas descritas (Bahamas, Islas vírgenes, Mar Rojo, Mar de Cortés, Palau, Guam) y de la Barrera de Arrecifes, siendo la especie más abundantemente aislada. La especie propuesta como '*S. pacifica*' es menos frecuente y de distribución más restringida respecto a la anterior recuperándose de muestras de Guam, Palau y del Mar Rojo (no habiendo sido recuperada del Caribe ni del Mar de Cortés aún) y también de la Barrera de Arrecifes y de Fiji. *S. tropica* posee una distribución al parecer aún más restringida. Ésta se ha recuperado solamente de muestras de las Bahamas.

Estas bacterias son aerobias Gram positivas, formadoras de esporas (Figura 9) y poseen un contenido Guanina y Citosina (G+C) de entre 70-73%. Las primeras colonias comienzan a aparecer entre las 3 a 6 semanas de incubación dependiendo del medio de cultivo, muestran falta de micelio aéreo y su pigmentación puede ser naranja brillante o pálida y café oscuro o

¹⁰ Regiones tropicales: Mar Rojo, Guam, Mar Caribe (Islas Vírgenes de EE. UU.), Palau, Fiji. Regiones subtropicales: Mar de Cortés, las Bahamas. La Gran Barrera de Arrecifes posee un clima que va de tropical a subtropical.

negro cuando esporulan (como varios miembros de la misma familia, Figura 7d). Esto es muy similar a las colonias del género *Micromonospora*, pero a diferencia de éste, miembros de *Salinispora* tienen un crecimiento obligado de agua marina [Mincer *et al.*, 2002; Jensen *et al.*, 2005b].

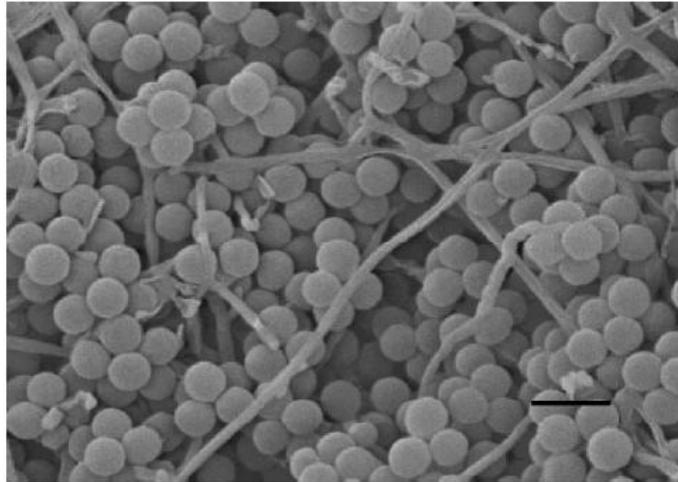


Fig. 9 Micrografía electrónica de *Salinispora tropica* con un aumento 8 000 x. La barra representa 1 μm [Maldonado *et al.*, 2005a].

Este grupo taxonómico ha demostrado ser una fuente productiva de metabolitos secundarios con actividad biológica que pueden ser utilizados como principios activos, son compuestos estructuralmente únicos además de poseer mayor potencia que sus análogos terrestres [Feling *et al.*, 2003; Jensen *et al.*, 2005a; Fenical *et al.*, 2006].

Cepas correspondientes *S. arenicola* expresan un gen que codifica para la síntesis de una policétido sintasa (PKS) relacionada con la rifampicina B. Este es un gen homólogo al que presenta *Amycolatopsis mediterranei*, actinobacteria terrestre que produce este antibiótico [Kim *et al.*, 2006; Jensen *et al.*, 2007]. Se ha observado la presencia de compuestos como éste, pertenecientes al grupo de las rifamicinas, cuando estas actinobacterias interactúan en simbiosis con esponjas marinas de la especie *Pseudoceratina clavata* (aislada de la Gran Barrera de Arrecifes australiana). Las rifamicinas son utilizadas en la clínica como tratamiento para la tuberculosis y otras enfermedades bacterianas pero su eficacia ha sido mermada por la aparición de cepas resistentes. Aislados pertenecientes a la especie *S. arenicola* se consideran la primer fuente potencial de rifamicina fuera del género *Amycolatopsis* y además la primer fuente de origen marino [Kim *et al.*, 2006; Jensen *et al.*, 2007].

Algunos metabolitos secundarios de relevancia que han sido aislados del género *Salinispora* se encuentran enlistados en la Tabla 3 y en la Figura 10 se ilustran estas complejas moléculas, algunas de las cuales incluyen grupos halógeno en su estructura.

Tabla 3. Metabolitos secundarios aislados de algunos miembros del género *Salinispora*.

Compuesto	Fuente	Actividad biológica	Blanco biológico
Salinisporamida A	<i>S. tropica</i>	Anticancerígeno	Proteosomas
Esporólido A	<i>S. tropica</i>	Desconocido	Desconocido
Rifamicina	<i>S. arenicola</i>	Antibiótico	RNA polimerasa
Estaurosporina	<i>S. arenicola</i>	Anticancerígeno	Proteína cinasa
Saliniketal	<i>S. arenicola</i>	Quimiopreventivo de cáncer	Ornatin decarboxilasa
Arenicolida A	<i>S. arenicola</i>	Desconocido	Desconocido
Ciclomarina A	<i>S. arenicola</i>	Antiinflamatorio, antiviral	Desconocido, desconocido
Cianosporasida A	" <i>S. pacifica</i> " ¹¹	Desconocido	Desconocido
Salinispirona	" <i>S. pacifica B</i> " ¹²	Desconocido	Desconocido

[Jensen *et al.*, 2007].

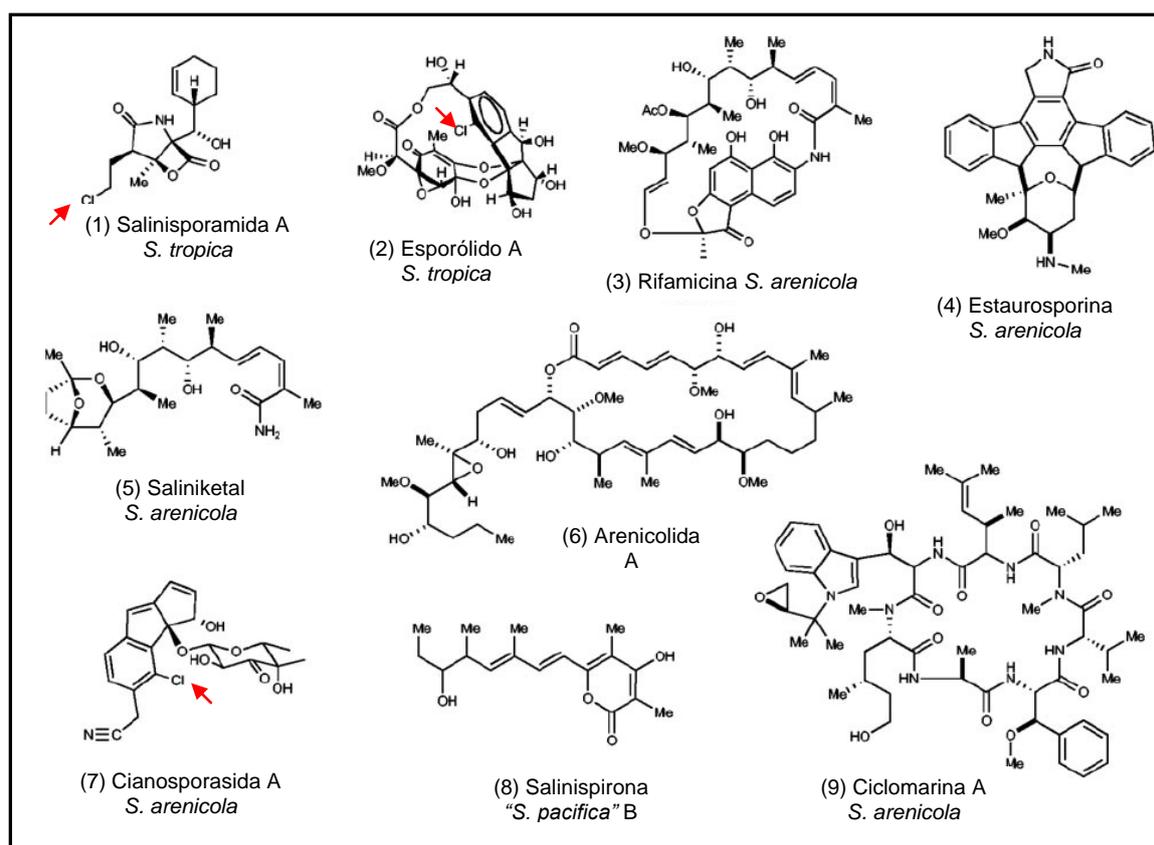


Fig. 10 Estructura química de metabolitos secundarios aislados de *Salinispora*. Las flechas indican la presencia de cloro en la molécula [modificada de Jensen *et al.*, 2007].

¹¹ "*S. pacifica*" corresponde a las cepas: CNH-732 (DQ224165), CNR-114 (DQ224161), CNQ-768, CNS-103 (DQ224159) y CNS-143.

¹² "*S. pacifica B*" corresponde a la cepa CNS-237 (DQ318246)

2.4.1.2 El género *Verrucosispora*.

El trabajo realizado por Rheims y colaboradores en 1998 describe al género *Verrucosispora*. El aislado proviene de la turba cenagosa cerca de Gifhorn, Baja Sajonia, estado del noroeste de Alemania. Este aislado se trata de una bacteria Gram positivas, aerobia, formadora de esporas rugosas (Figura 11), con un contenido G+C de 70%. El aislado originalmente se designó como “HR1-2” y posteriormente se le describió y denominó *Verrucosispora gifhornensis*. La combinación única de características morfológicas, quimiotaxonómicas y propiedades filogenéticas lo distinguen y definen como un nuevo género dentro de la familia *Micromonospraceae*.

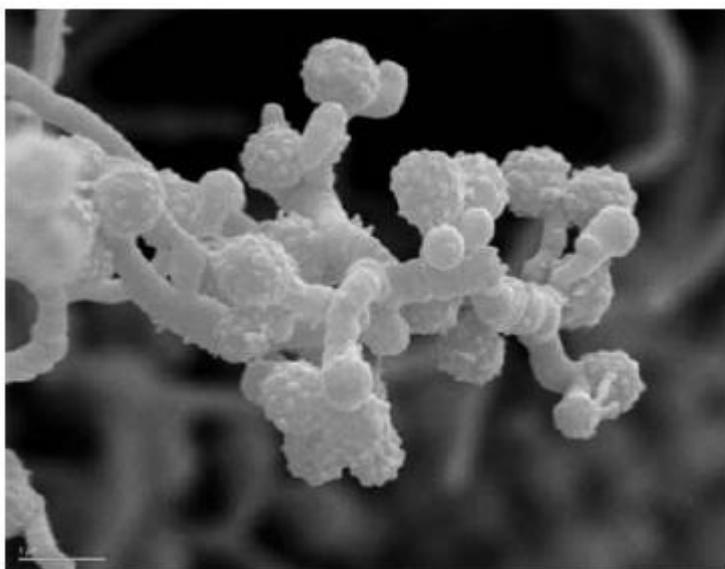


Fig. 11 Micrografía electrónica de barrido de *Verrucosispora* AB-18-032. La barra representa 1 μm [Fiedler *et al.*, 2005].

De acuerdo al análisis comparativo del gen 16S rRNA y la presencia de nucleótidos-signature específicos de la familia *Micromonosporaceae* éste género demostró su correlación filogenética con ésta al mostrar más del 95% de similitud. La búsqueda de otros nucleótidos-signature mostró que este género guarda una gran similitud con respecto al género *Micromonospora*. Posteriormente, con la detección y descripción formal del género *Salinispora* [Maldonado *et al.*, 2005a] se advirtió su cercanía a este último reivindicando su posición, quedando adyacente a ambos géneros (Figura 1).

Aunque morfológicamente es parecido a especies del género *Micromonospora* se distingue de éstas e incluso de otros miembros de la familia *Micromonosporaceae* ya que no

contiene arabinosa en los azúcares de la célula y contiene un segmento único de nucleótidos-signature. Además, morfológicamente muestra poseer micelio de sustrato bien definido donde crecen las esporas en forma individual. Carece de micelio aéreo y de esporangio, además en las partes envejecidas el micelio presenta estructuras granuladas o rugosas. Forma colonias anaranjadas y conforme transcurre el tiempo se tornan cafés [Rheims *et al.*, 1998].

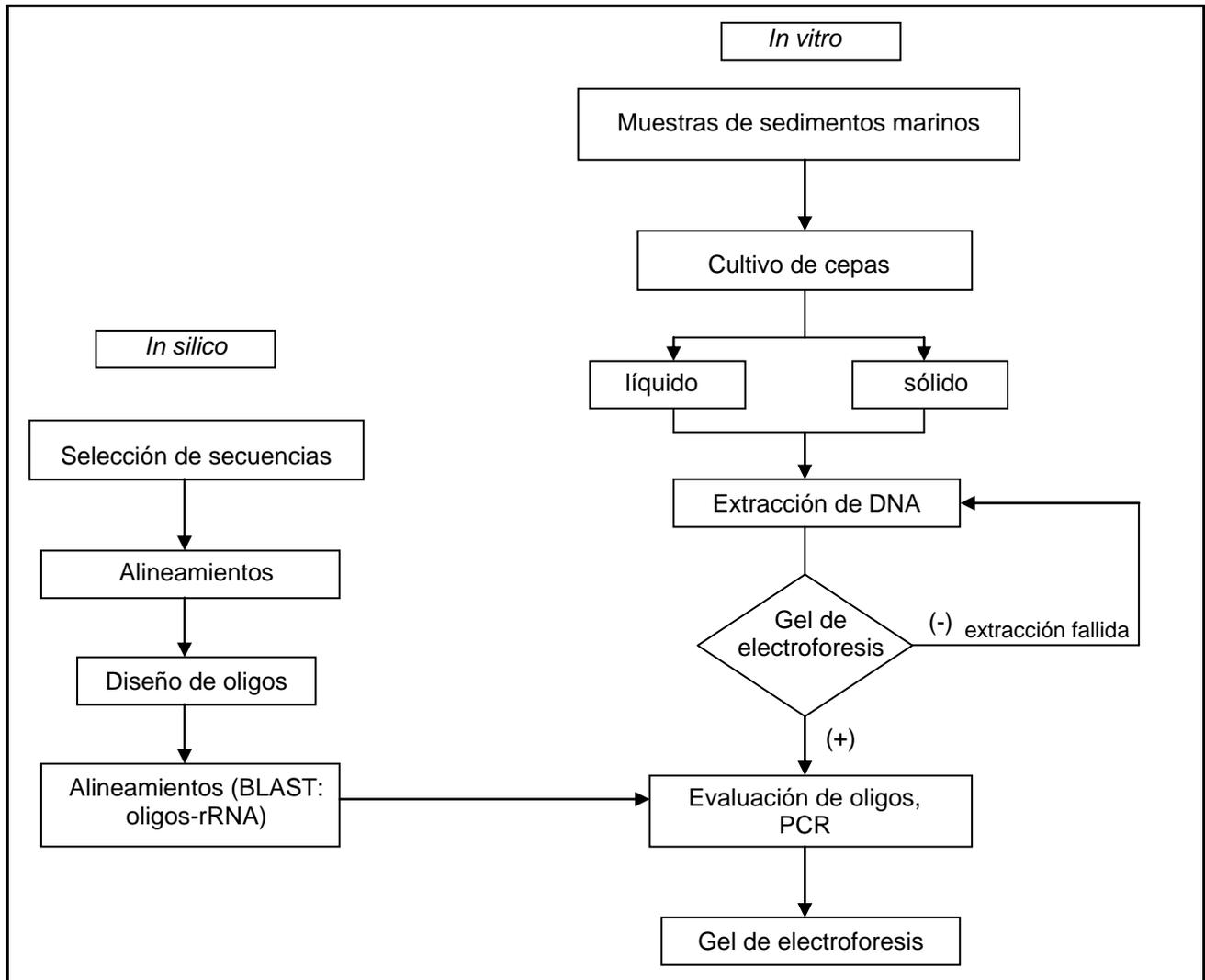
Verrucosipora gifhornensis no ha demostrado producir algún metabolito secundario de interés, sin embargo, se ha reportado una nueva cepa perteneciente a este género, aislada del Mar de Japón y designada como AB-18-032 [Riedlinger, 2004], que produce la única familia de policétidos policíclicos de abisomicina, particularmente la abisomicina C un fuerte inhibidor de la síntesis de ácido *p-aminobenzoico* [Riedlinger, 2004]. Este metabolito secundario es activo contra bacterias Gram positivas incluyendo cepas multiresistentes y contra *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina lo que le confiere gran potencial para ser desarrollado como agente antibacterial para patógenos resistentes a otros tratamientos [Lam, 2006].

'*Verrucosipora maris*' o AB-18-032 y el aislado MG37, producen las proximicinas que poseen carácter antibacteriano y antitumoral [Fiedler *et al.*, 2008]. De éstas, la proximicina A resulta ser un anticancerígeno de entre 10 a 15 veces más potente que la netropsina, obtenida de *Streptomyces netropsis* (aislado terrestre), además de presentar selectividad moderada contra tres líneas celulares de cáncer [Williams, 2008].

3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

3.1 Materiales y Métodos.

El diseño experimental para el presente proyecto está dividido en dos ramas: *in silico* e *in vitro* y está esquematizado en términos generales en el siguiente diagrama de flujo:



3.1.1 *In silico*. Alineamientos utilizando el programa BLAST.

Utilizando el programa BLAST¹ [Altschul *et al.*, 1997], de dominio público y disponible en la página de Internet del NCBI [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>], se efectuaron los alineamientos de cada uno de los oligos en estudio para verificar *in silico* su especificidad al grupo taxonómico en estudio.

Debe mencionarse que detrás del alineamiento de secuencias existe un trasfondo estadístico del cual provienen los datos que permiten el ordenamiento y el análisis de los

¹ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

resultados por lo que resulta de importancia explicar el significado de cada uno de los valores que se obtienen una vez realizado el BLAST [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Web/Newsltr/V15N2/BLView.html>].

Los valores correspondientes a *E(xpect) value*, *Max(imum) score* y *Max(imum) identity*, aluden a cada segmento alineado de manera independiente.

- ***E-value*** o valor esperado representa el número de alineamientos esperados al azar con una puntuación particular (indicada en los parámetros de búsqueda) o la mejor. Por ejemplo, si se obtiene un valor de 1 se puede interpretar que en la base de datos se puede encontrar un alineamiento con los mismos valores pero hallado totalmente al azar. Por ello, se puede considerar que cuanto menor sea el *E-value* o cuanto más cercano esté a cero se obtiene un mejor resultado, o de una menor probabilidad de que haya sido alcanzado por azar. Pero esto puede variar porque para calcular este valor se toma en cuenta la longitud de la secuencia estudiada.
- ***Max score*** o puntuación máxima, calculado a partir de la suma de las coincidencias y de la falta de coincidencias entre los nucleótidos de una secuencia particular con respecto a la alineación con un conjunto de segmentos (de la misma base de datos).
- ***Max identity*** o máxima identidad, es la identidad dada en porcentaje para una secuencia alineada con respecto a la secuencia estudiada, es decir, el número de nucleótidos que son idénticos entre ambas. Es importante mencionar que para que dos secuencias sean consideradas homólogas deben presentar una similitud de más del 70% en la secuencia de nucleótidos (*Max ident*).
- ***Total score*** o puntaje total, es la suma de la puntuación del alineamiento de todos los segmentos obtenidos.
- El valor dado para ***Query coverage*** es el porcentaje de la longitud de la secuencia estudiada incluida en el segmento alineado y está calculada sobre todos los segmentos alineados.

Así, de la evaluación *in silico* de los oligos trabajados se obtuvieron los datos de correspondencia entre los oligos y secuencias de DNA para los primeros 10 microorganismos con 100% de identidad (apartado 4.1 de la sección de Resultados y Discusión).

3.1.2 *In vitro*.

3.1.2.1 Cultivo.

Se inocularon 40 μ L de cultivo líquido de los microorganismos de trabajo (Tabla 4) en 50 mL de caldo A1², de forma alterna se inocularon 30 μ L en medio GYM³ preparado con agua marina.

Tabla 4. Microorganismos de trabajo.

Cepa	Asignación
AB-1	<i>Salinispora</i> sp.
AN-1	<i>Salinispora</i> sp.
AP-1	<i>Salinispora</i> sp.
AQ-1	<i>Salinispora</i> sp.
BB-1	<i>Solwaraspora</i> sp.
BC-1	<i>Solwaraspora</i> sp.

[con base en el trabajo de Maldonado *et al.*, 2008]

Los microorganismos se cultivaron previamente en medio sólido y se sembraron en medio GYM-agua marina y de forma alterna una asada se inoculó en caldo A1-agua marina.

Los microorganismos se incubaron a 30° C por 20 días. Aquellas cepas que mostraron buen desarrollo se seleccionaron para realizar posteriormente la extracción de DNA.

Todos los microorganismos de trabajo fueron obtenidos de sedimentos marinos mediante un aislamiento selectivo, con excepción de las cepas de referencia indicadas en la Tabla 5. Los sedimentos se tomaron a una profundidad de 300 m en el Golfo de California durante la campaña del Buque Oceanográfico El Puma durante febrero de 2006 [Maldonado *et al.*, 2008].

Tabla 5. Microorganismos cultivados en medio sólido.

² Caldo A1. Almidón 10 g, extracto de levadura 4 g, peptona 2 g, agua marina 1 L; ajustando a pH 7.

³ Medio GYM (agar-glucosa-extracto de levadura y malta). Glucosa 4 g, extracto de levadura 4 g, extracto de malta 10 g, carbonato de calcio 2 g, agua marina 1 L; ajustando a pH 7 a 7.2.

Cepa	Asignación
28a56-3	<i>Verrucosispora</i> sp.
DSM-44337	<i>Verrucosispora gifhornensis</i>
e37	<i>Verrucosispora</i> sp.
e80	<i>Verrucosispora</i> sp.
AB18-a-032	' <i>Verrucosispora maris</i> '
CNH-440	<i>Salinispora tropica</i>
CNH-536	<i>Salinispora tropica</i>
CNH-643	<i>Salinispora</i> sp.
CNH-898	<i>Salinispora</i> sp.
CNH-964	<i>Salinispora arenicola</i>

3.1.2.2 Extracción de DNA (método de alcohol isoamílico-fenol-cloroformo).

Para la extracción de DNA se utilizaron los microorganismos indicados en las Tablas 4 y 5, tanto de caldo A1 como del medio GYM.

La extracción de DNA se efectuó de acuerdo al siguiente procedimiento:

1. En tubos Eppendorf de 2.0 mL se adicionaron 500 μ L de solución GTE⁴ y 100 μ g de perlas de vidrio de 106 μ m de diámetro y se colocó una asada de las actinobacterias cultivadas en medio sólido o 500 μ L de aquellas creciendo en cultivo líquido.
2. Se agitó en vórtex a máxima potencia durante 15 minutos y se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a otro tubo Eppendorf y se descartó la biomasa.
3. Se efectuó la extracción adicionando alcohol isoamílico:fenol:cloroformo (25:24:1) equivalente al mismo volumen de sobrenadante recuperado y se agitó en vórtex 5 segundos a máxima potencia.
4. Se centrifugó bajo las condiciones ya descritas y se separó la fase acuosa transfiriendo el volumen recuperado a otro tubo Eppendorf de 1.5 mL y se repitió la extracción.

⁴ Solución GTE (Glucosa-Tris-EDTA). Para 100 mL: 0.9 g de glucosa, 2.5 mL Tris pH 8 1M, 2 mL EDTA 0.5 M, 94.5 mL de agua destilada. Esta solución debe someterse a esterilización en autoclave.

-
5. Se adicionó etanol frío al 100% (el doble del volumen de fase acuosa recuperada). Se agitó manualmente con suavidad invirtiendo los tubos para permitir la precipitación del DNA.
 6. Para recuperar el DNA y purificarlo se procedió a centrifugar las muestras durante 12 minutos a 14 000 rpm a temperatura ambiente. Se decantó y se resuspendió el botón o pastilla formado en el fondo del tubo con etanol al 70% (alrededor de 400 μ L).
 7. Se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones, decantando y repitiendo una vez más este lavado.
 8. Finalmente se decantó y se evaporó completamente el etanol remanente. Una vez evaporado el etanol se adicionaron 50 μ L de buffer TE⁵ a pH 8.0 a una concentración 1x y se colocó en un baño seco a 55° C durante 30 minutos, agitando suavemente de forma regular con la finalidad de disolver en lo posible la pastilla de DNA formada.
 9. El DNA purificado se conservó en refrigeración a 4° C.

Para visualizar la obtención de DNA y realizar un posterior PCR se realizó una electroforesis horizontal utilizando gel de agarosa al 1%.

3.1.2.3 Amplificación mediante PCR.

Para la amplificación mediante PCR se efectuó el siguiente procedimiento:

1. Se preparó una mezcla de reacción en tubos Eppendorf con: 5 μ L buffer PCR⁶, 1.5 μ L MgCl₂ (50 mM), 1.25 μ L dNTPs (10mM), 0.3 μ L de Oligo-1 (forward), 0.3 μ L de Oligo-2 (reverso), de 0.5 a 0.7 μ L de DNA y se adicionó el volumen de buffer necesario para llevar a un volumen final de 49.9 μ L. Para el control negativo se utilizó 0.5 μ L de agua destilada para sustituir el DNA.

⁵ Buffer TE (Tris-EDTA). 1 mL Tris 1M pH 8, 200 μ L EDTA 0.5M, 99 mL agua destilada.

⁶ Buffer PCR 10x. 4 mL Tris pH 8.3 100 mM, 20 mL KCl 500 mM, 15.6 mL de agua destilada.

2. Los tubos se colocaron en termociclador (Techne modelo TC-512) para correr el PCR durante 35 ciclos; 0.1 μ L de *Taq* polimerasa (5U/ μ L) se adicionaron antes de concluir el paso de desnaturalización inicial, teniendo así un volumen final de 50.0 μ L.

Las combinaciones de oligos a evaluar: M2F-A3R bajo las condiciones del programa *MICROM 60 45x3* y *MICROM modificado* (diferente temperatura de alineamiento). M2F-A3R, M2F-Sal1r, M2F-Sal2r, Sal1F-Sal1r y Sal1F-Sal2r fueron bajo las condiciones del programa *GORD 68 45x3*. Las condiciones de temperatura y tiempo para cada uno de los programas utilizados se enlistan en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de los programas de PCR empleados.

	MICROM 60 45x3	MICROM modificado	GORD 68 45x3
Desnaturalización inicial	94° ⁷ /150 s	94°/150 s	94°/300 s
Desnaturalización	95°/45 s	95°/45 s	95°/45 s
Alineamiento	60°/45 s	65°/45 s	68°/45 s
Extensión	72°/45 s	72°/45 s	72°/45 s
Extensión final	72°/150 s	72°/150 s	72°/300 s

Los productos de la amplificación para los respectivos pares de oligos (Tabla 7) se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%, en buffer TBE 0.5x⁸. Para el caso de las combinaciones Sal1F-Sal1r y Sal1F-Sal2r se utilizaron geles de agarosa al 2%.

Tabla 7. Oligos específicos para la identificación de miembros de la clase *Actinobacteria* evaluados en este estudio.

Grupo taxonómico blanco	Oligo	Secuencia 5'-3'	Fragmento esperado (bp⁹)	Referencia
<i>Micromonosporaceae</i>	A3R M2F	CCAGCCCCACCTTCGAC ¹⁰ SAGAAGAAGCGCCGGCC	1 000	Monciardini <i>et al.</i> , 2002
<i>Salinispora</i>	Sal1F	CTGTGTTGGGTGGTGGG		Maldonado (sin publicar)
<i>Salinispora</i>	Sal1r	CCCACCACCCAACACAG		Maldonado (sin publicar)
<i>Salinispora</i>	Sal2r	AGCACCAGCCGCATCATCAACCC		Maldonado (sin publicar)
<i>Verrucosipora</i>	V158-F	GCATGTTTGTGGGTGGAAAG		Goodfellow (sin publicar)
<i>Verrucosipora</i>	V1083-R	GAATTGCTGGCAACATGGG		Goodfellow (sin publicar)

⁷ ° para expresar ° C.

⁸ Buffer TBE 0.5x. A partir de solución stock de TBE 10x, llevando a volumen final con agua destilada. La solución TBE 10x (Tris-Borato-EDTA) está compuesta por 1 g NaOH, 108 g Tris base, 55 g ácido bórico, 7.4 g EDTA, aforando con agua destilada a 1 L.

⁹ bp. De las siglas en inglés de “base pairs” o pares de bases, utilizado como una medida de peso molecular.

¹⁰ Código IUPAC (que corresponde a las siglas de *International Union of Pure and Applied Chemistry*) para sucesión de nucleótidos **A** adenina, **C** citosina, **G** guanina, **T** timina, **S** guanina o citosina.

3.1.2.4 Electroforesis horizontal (gel de agarosa).

Para comprobar la obtención de DNA a partir de la extracción y determinar si el DNA ha sido amplificado por PCR obteniendo el fragmento deseado, se realizó una electroforesis horizontal seguida de su visualización utilizando un transiluminador con luz UV y tomando una fotografía de la imagen con un fotodocumentador.

Para elaborar el gel se utilizó el siguiente procedimiento:

1. El gel de agarosa al 1% se elaboró pesando un gramo de agarosa por 100 mL de buffer TBE 0.5x. En un matraz Erlenmeyer se adicionó el buffer y posteriormente la agarosa, calentando en microondas para disolverla.
2. Después de esperar a que se enfriara se adicionó 1 μ L de bromuro de etidio por cada 100 mL de disolución (5 mg/mL) y se mezcló para homogeneizar.
3. Se decantó la mezcla en la charola de electroforesis a la cual previamente se le colocaron los peines para formar los pozos y se permitió la solidificación del gel durante 30 a 60 minutos, tiempo después del cual se retiraron los peines (Figuras 12a y 13).
4. La cámara para electroforesis se llenó con buffer TBE 0.5x sumergiendo el gel y permitiendo que los pozos se llenaran con el buffer.
5. Para cargar las muestras en el gel se mezclaron 4 μ L de buffer de carga¹¹ 6x y 4 μ L de muestra de DNA o de la amplificación obtenida por PCR, preparando también 1 μ L de marcador de peso molecular (HyperLadder I, BIOLINE). Las muestras y el marcador se cargaron en los pozos del gel utilizando micropipeta.

¹¹ Buffer de carga (loading dye). Para 100 mL: 0.25g xileno-cianol, 0.25 g azul de bromofenol, 1 mL Tris 1M pH 8, 49 mL agua destilada, 50 mL glicerol.

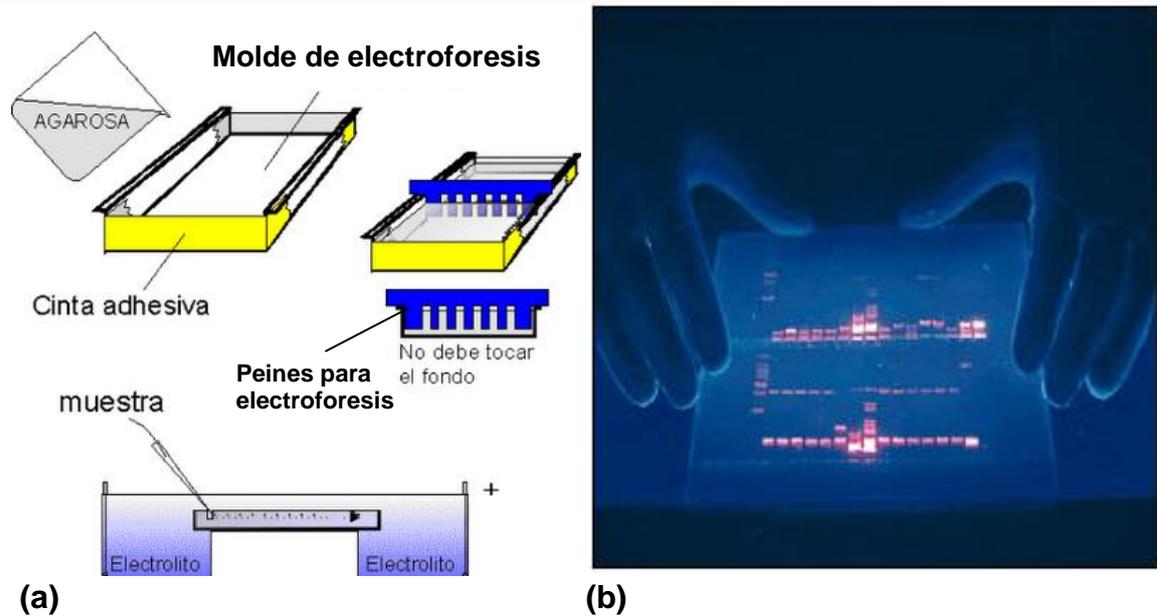


Fig. 12 (a) Vertido del gel de agarosa como líquido en el molde, disposición adecuada de los peines y carga de la muestra una vez que ha solidificado, todo colocado en la charola de electroforesis y sumergiéndola en buffer TBE; (b) Imagen de la visualización de un gel utilizando el transiluminador. El bromuro de etidio es un intercalante del DNA que absorbe a la longitud de onda de la luz UV, es decir, se insertará en el DNA y permitirá su visualización en el gel al utilizar luz UV observándose bandas naranjas (en la foto se aprecian rosa) [<http://idibam.blogspot.com/2008/09/electroforesis-en-gel-de-agarosa.html>].

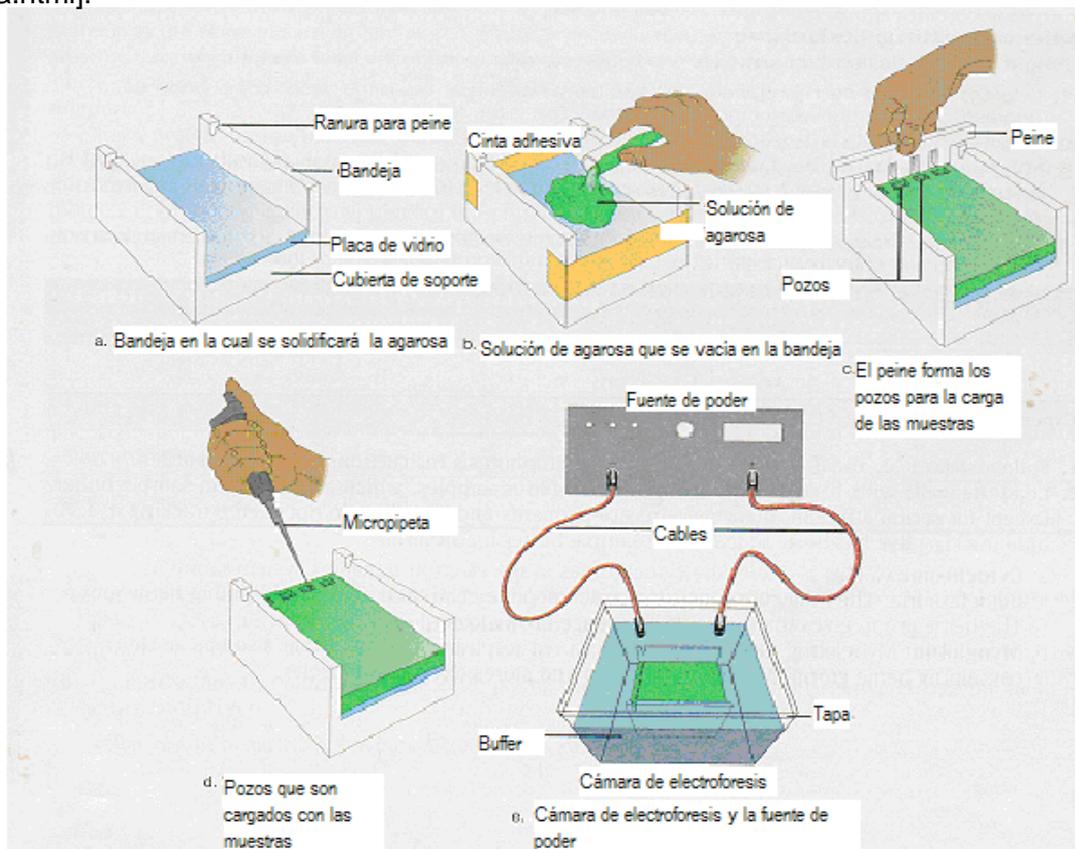


Fig. 13 Procedimiento para preparar un gel de agarosa: (a) charola de electroforesis horizontal, (b) vertido de la solución de agarosa, (c) inserción de los peines para permitir la formación de los pozos durante la solidificación del gel, (d) cargado de la muestra en los pozos una vez solidificado el gel, (e) cámara para electroforesis en donde la charola con el gel se sumerge en buffer, la cámara se cierra y conectan los electrodos para permitir el paso de corriente y correr la electroforesis [http://a32.lehman.cuny.edu/molbio_course/agarosa.1htm].

-
6. Habiendo colocado la tapa a la cámara de electroforesis se conectaron los electrodos y se corrió por un tiempo y a una diferencia de potencial determinados: 30 minutos y una diferencia de potencial de 70 V para la evaluación de la calidad de DNA extraído y a 100 V para determinar la obtención del producto de PCR para el juego de oligos estudiado.

 7. Una vez transcurrido el tiempo se retiró el gel de la charola para visualizar las bandas obtenidas (Figura 12b), tomando una fotografía de la imagen en el transiluminador utilizando luz UV.

La obtención de una banda de peso molecular similar al esperado para el par de oligos evaluado (producto de PCR) se considera prueba positiva y la ausencia de banda se considera como negativo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4. 1 *In silico*. Alineamientos utilizando el programa BLAST.

◆ Para la familia *Micromonosporaceae*:

I. Oligo A3R

Acceso	Descripción	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AB490769.1	<i>Micromonosporaceae bacterium</i> K07-0523 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	34.2	54.5	100%	0.041	100%
FM208262.1	<i>Micromonosporaceae bacterium</i> NBRC 104875 partial 16S rRNA gene, type strain NBRC 104875T	34.2	54.5	100%	0.041	100%
FM208261.1	<i>Micromonosporaceae bacterium</i> NBRC 104874 partial 16S rRNA gene, type strain NBRC 104874T	34.2	54.5	100%	0.041	100%
AB505224.1	<i>Nonomuraea coxensis</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: JCM 13931	34.2	54.5	100%	0.041	100%
FJ937937.1	<i>Micromonospora matsumotoense</i> strain LS279 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	54.5	100%	0.041	100%
FJ911539.1	<i>Micromonospora</i> sp. YIM 75717 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	34.2	100%	0.041	100%
FJ911535.1	<i>Kribbella</i> sp. YIM 75715 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	54.5	100%	0.041	100%
FJ911534.1	<i>Kribbella</i> sp. YIM 75703 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	34.2	54.5	100%	0.041	100%
AB500943.1	<i>Micromonospora</i> sp. YSL-5 gene for 16S rRNA, partial sequence	34.2	34.2	100%	0.041	100%
CP000667.1	<i>Salinispora tropica</i> CNB-440, complete genome	34.2	5795	100%	0.041	100%

II. Oligo M2F.

Acceso	Descripción	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AB490769.1	<i>Micromonosporaceae bacterium</i> K07-0523 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	33.5	33.5	94%	0.10	100%
FJ973607.1	<i>Dactylosporangium salmoneum</i> strain NRRL B-16294 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	33.5	33.5	94%	0.10	100%
FJ973606.1	<i>Dactylosporangium aurantiacum</i> strain NRRL B-8108 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	33.5	33.5	94%	0.10	100%
FJ973605.1	<i>Dactylosporangium</i> sp. BK63 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	33.5	33.5	94%	0.10	100%
FJ973604.1	<i>Dactylosporangium</i> sp. BK51 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	33.5	33.5	94%	0.10	100%
FM208262.1	<i>Micromonosporaceae bacterium</i> NBRC 104875 partial 16S rRNA gene, type strain NBRC 104875T	33.5	33.5	94%	0.10	100%
FM208261.1	<i>Micromonosporaceae bacterium</i> NBRC 104874 partial 16S rRNA gene, type strain NBRC 104874T	33.5	33.5	94%	0.10	100%
FJ966188.1	<i>Micromonospora</i> sp. BMG5723 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	33.5	33.5	94%	0.10	100%
FJ966166.1	<i>Micromonospora</i> sp. BMG5718 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	33.5	33.5	94%	0.10	100%
FJ966165.1	<i>Micromonospora</i> sp. BMG5713 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	33.5	33.5	94%	0.10	100%

Se puede apreciar que este par de oligos se corresponde a secuencias presentes en el gen 16S rRNA de miembros de la familia *Micromonosporaceae*, justamente este juego de oligos fue diseñado teniendo como blanco esta familia. Sin embargo, a pesar de que el oligo M2F muestra especificidad por miembros de esta familia, para el caso de A3R hay que mencionar que *Nonomuraea coxensis* y *Kribbella* sp. no pertenecen a ésta aunque muestran buenos valores-E y de máxima identidad.

♦ Para el género *Salinispora*:

III. Oligo Sal1F.

Acceso	Descripción	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
CP000850.1	<i>Salinispora arenicola</i> CNS-205, complete genome	34.2	2997	100%	0.041	100%
AY371900.1	<i>Salinispora arenicola</i> strain CNH-964 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence	34.2	34.2	100%	0.041	100%
AY371898.1	<i>Salinispora arenicola</i> strain CNH-646 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence	34.2	34.2	100%	0.041	100%
AY371897.1	<i>Salinispora arenicola</i> strain CNH-643 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence	34.2	34.2	100%	0.041	100%
AM420293.1	<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL2338 complete genome	32.2	2481	100%	0.16	100%
CP000820.1	<i>Frankia</i> sp. EAN1pec, complete genome	30.2	3112	100%	0.64	100%
CP000511.1	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1, complete genome	30.2	2231	100%	0.64	100%
AM412059.1	<i>Mycobacterium bovis</i> BCG complete genome, strain Moreau RDJ	28.2	1897	100%	2.5	100%
AP010918.1	<i>Mycobacterium bovis</i> BCG str. Tokyo 172 DNA, complete genome	28.2	1897	100%	2.5	100%
CP000717.1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> F11, complete genome	28.2	1938	100%	2.5	100%

IV. Oligo Sal1r.

Acceso	Descripción	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
CP000850.1	<i>Salinispora arenicola</i> CNS-205, complete genome	34.2	2936	100%	0.041	100%
	<i>Salinispora arenicola</i> strain CNH-964 16S-23S					
AY371900.1	ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence	34.2	34.2	100%	0.041	100%
	<i>Salinispora arenicola</i> strain CNH-646 16S-23S					
AY371898.1	ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence	34.2	34.2	100%	0.041	100%
	<i>Salinispora arenicola</i> strain CNH-643 16S-23S					
AY371897.1	ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence	34.2	34.2	100%	0.041	100%
AM420293.1	<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL2338 complete genome	32.2	2481	100%	0.16	100%
CP000820.1	<i>Frankia</i> sp. EAN1pec, complete genome	30.2	3112	100%	0.64	100%
CP000511.1	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1, complete genome	30.2	2231	100%	0.64	100%
AM412059.1	<i>Mycobacterium bovis</i> BCG complete genome, strain Moreau RDJ	28.2	1897	100%	2.5	100%
AP010918.1	<i>Mycobacterium bovis</i> BCG str. Tokyo 172 DNA, complete genome	28.2	1897	100%	2.5	100%
CP000717.1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> F11, complete genome	28.2	1938	100%	2.5	100%

V. Oligo Sal2r.

Acceso	Descripción	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
CP000850.1	<i>Salinispora arenicola</i> CNS-205, complete genome	46.1	4093	100%	4e-05	100%
CP000667.1	<i>Salinispora tropica</i> CNB-440, complete genome	46.1	3480	100%	4e-05	100%
	<i>Salinispora arenicola</i> strain CNH-964 16S-23S					
AY371900.1	ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence	46.1	46.1	100%	4e-05	100%
	<i>Salinispora tropica</i> strain CNH-898 16S-23S					
AY371899.1	ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence	46.1	46.1	100%	4e-05	100%
	<i>Salinispora arenicola</i> strain CNH-646 16S-23S					
AY371898.1	ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence	46.1	46.1	100%	4e-05	100%
	<i>Salinispora arenicola</i> strain CNH-643 16S-23S					
AY371897.1	ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence	46.1	46.1	100%	4e-05	100%
	<i>Salinispora tropica</i> strain CNB-440 16S-23S					
AY371895.1	ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence	46.1	46.1	100%	4e-05	100%
	<i>Salinispora tropica</i> strain CNB-536 16S-23S					
AY371896.1	ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence	38.2	38.2	100%	0.009	95%
AP009256.1	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703 DNA, complete genome	34.2	1423	100%	0.14	100%
CP000386.1	<i>Rubrobacter xylanophilus</i> DSM 9941, complete genome	34.2	1911	100%	0.14	100%

Los oligos Sal1F y Sal1r diseñados para el género *Salinispora*, de acuerdo al *E-value*, muestran coincidir mejor con cepas del género blanco y aunque coinciden con secuencias de otras actinobacterias ninguna de ellas corresponde a cepas de *Verrucosipora* ni *Micromonospora* u otro miembro de la familia. Esto es importante porque se pretende que con el uso de estos oligos se pueda discriminar entre estos dos géneros muy estrechamente relacionados con *Salinispora* (texto en rojo). Igualmente, por esta relación filogenética tan estrecha es que se ha recurrido al uso de la secuencias intergénicas 16S-23S rRNA para Sal1F, Sal1r y Sal2r (texto resaltado). Éste último oligo mostró una mejor cobertura del género *Salinispora* reflejado en el gran número de cepas del género para las cuales coincide, igualmente muestra una mejor relación con la secuencia blanco que se aprecia en los valores-E bajos.

♦ **Para el género *Verrucosipora*:**

VI. Oligo V158-F.

Acceso	Descripción	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FJ465009.1	Uncultured <i>Verrucosipora</i> sp. clone XM3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.002	100%
FJ465008.1	Uncultured <i>Verrucosipora</i> sp. clone XM2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.002	100%
FJ465007.1	Uncultured <i>Verrucosipora</i> sp. clone XM1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.002	100%
FJ465006.1	Uncultured <i>Verrucosipora</i> sp. clone MG3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.002	100%
FJ465005.1	Uncultured <i>Verrucosipora</i> sp. clone MG2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.002	100%
FJ465004.1	Uncultured <i>Verrucosipora</i> sp. clone MG1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.002	100%
FJ465003.1	Uncultured <i>Verrucosipora</i> sp. clone DB5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.002	100%
FJ465002.1	Uncultured <i>Verrucosipora</i> sp. clone DB4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.002	100%
FJ465001.1	Uncultured <i>Verrucosipora</i> sp. clone DB3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.002	100%
FJ465000.1	Uncultured <i>Verrucosipora</i> sp. clone DB2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.002	100%

VII. Oligo V1063-R.

Acceso	Descripción	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FJ937939.1	<i>Verrucosispora</i> sp. LS284 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.2	38.2	100%	0.005	100%
FM177520.1	<i>Actinoplanes</i> sp. RP-AC33 partial 16S rRNA gene, type strain RP-AC33T	38.2	38.2	100%	0.005	100%
FJ465009.1	<i>Uncultured Verrucosispora</i> sp. clone XM3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.2	38.2	100%	0.005	100%
FJ465008.1	<i>Uncultured Verrucosispora</i> sp. clone XM2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.2	38.2	100%	0.005	100%
FJ465007.1	<i>Uncultured Verrucosispora</i> sp. clone XM1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.2	38.2	100%	0.005	100%
FJ465006.1	<i>Uncultured Verrucosispora</i> sp. clone MG3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.2	38.2	100%	0.005	100%
FJ465004.1	<i>Uncultured Verrucosispora</i> sp. clone MG1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.2	38.2	100%	0.005	100%
FJ465003.1	<i>Uncultured Verrucosispora</i> sp. clone DB5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.2	38.2	100%	0.005	100%
FJ465002.1	<i>Uncultured Verrucosispora</i> sp. clone DB4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.2	38.2	100%	0.005	100%
FJ465001.1	<i>Uncultured Verrucosispora</i> sp. clone DB3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	38.2	38.2	100%	0.005	100%

Estos últimos dos oligos, dirigidos al gen 16S rRNA del género *Verrucosispora* muestran *in silico* una buena relación con el género blanco tanto por la cobertura que tuvo al coincidir con secuencias de varias cepas del género así como por el *E-value* obtenido para los alineamientos.

Así, estas valoraciones *in silico* nos llevan a considerar una muy buena probabilidad para obtener una respuesta positiva de estos oligos para amplificar por PCR las secuencias blanco de los géneros a los cuales están destinados: *Salinispora* y *Verrucosispora*.

Hay que mencionar que esta evaluación *in silico* no puede considerarse totalmente completa ya que varias cepas de *Salinispora* utilizadas para la evaluación *in vitro* de estos oligos y algunas de *Verrucosispora* no cuentan con genomas totalmente secuenciados. Es por esto que sus alineamientos no quedaron considerados dentro del BLAST por la falta de esta información en la base de datos.

4.2 *In vitro*.

4.2.1 Extracción de DNA (método de alcohol isoamílico-fenol-cloroformo).

Para corroborar la obtención de DNA de calidad para PCR se corrió un gel horizontal con los resultados presentados en la Figura 14.

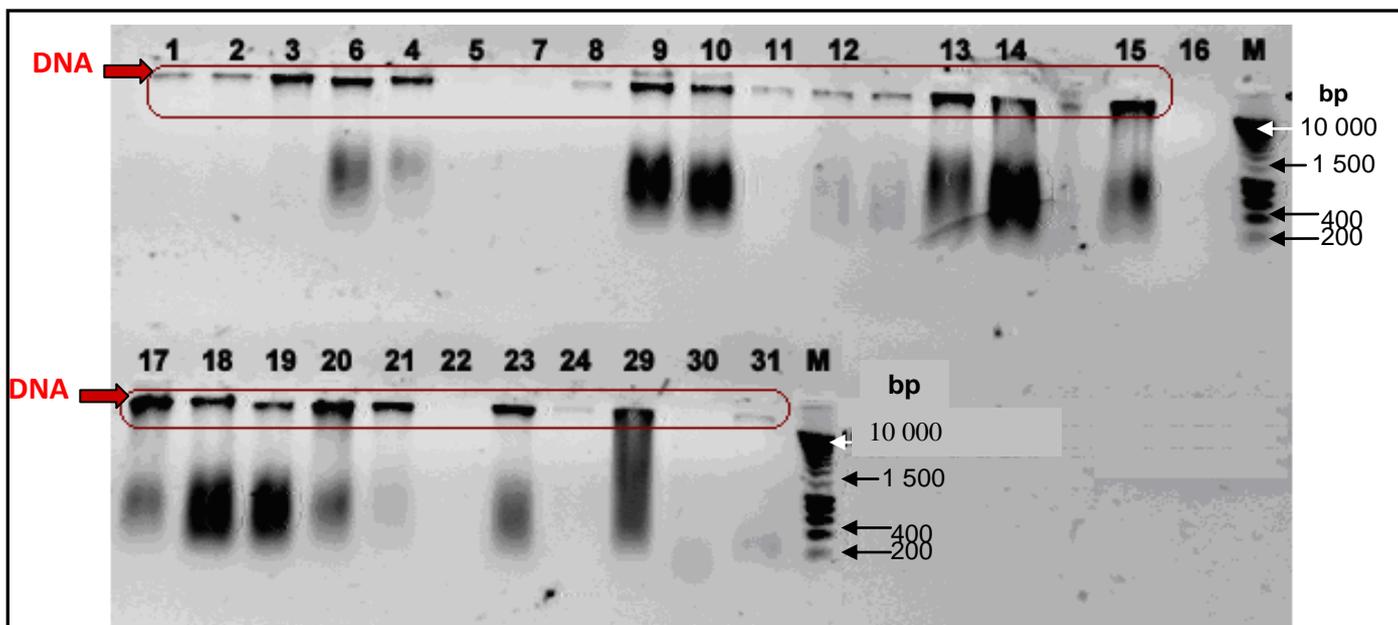


Fig. 14 Fotografía de la visualización del gel de agarosa. El orden de carga corresponde a: (1) 28a56-3, (2) *V. gifhornensis*, (3) e37, (6) BC1, (4) e80, (5) 28a56-3, (7) BB1, (8) AP1, (9) AB1, (10) AN1, (11) 28a-56-3, (12) *V. gifhornensis*, (13) e37, (14) e80, (15) AB18-a-032, (18) AB1, (19) AN1, (20) BB1, (21) BC1, (22) AP1, (23) AQ1, (29) CNH 964, (30) CNH 643, (31) CNH 536. Los pozos designados con la letra M corresponden al marcador de peso molecular. En la imagen se aprecian las bandas encerradas en un recuadro rojo. Condiciones de la electroforesis: 30 minutos, 70 V.

Después de visualizar el DNA se le asignó una concentración a partir de la intensidad de la banda obtenida en el gel proporcionando valores de 0 a 5 siendo 5 la mejor calidad (p. ej., banda 3, Figura 14). Las cepas con DNA de calidad 1 (p. ej., banda 24, Figura 14) y superior se utilizaron para efectuar la evaluación de los pares de oligos: M2F-A3R, M2F-Sal1r, M2F-Sal2r, Sal1F-Sal1r y Sal1F-Sal2r. La obtención de DNA está dada por la banda obtenida con un peso molecular de 10 000 bp o superior (indicada con una flecha roja en la Figura 14) que se corresponde con un peso elevado de las muestras de DNA total extraído.

De acuerdo a la intensidad de la banda podemos asumir que a mayor intensidad de ésta mayor concentración de DNA. De esta manera, aquellas muestras que mostraron banda pero con una intensidad demasiado leve fueron descartados pues se corría el riesgo de no tener lo necesario como para que la amplificación por PCR tuviera éxito. Esto es importante ya que la

concentración de DNA en la mezcla de reacción es uno de los factores clave para que ésta sea exitosa [Stenesh, 1989], además, los oligos pueden amplificar hasta un determinado mínimo de DNA (límite de detección).

4.2.2 Amplificación mediante PCR.

El DNA obtenido se utilizó como DNA molde para la amplificación por PCR utilizando los diferentes juegos de oligos y bajo las condiciones de los 3 programas de amplificación planteados. De esta evaluación se obtuvieron los resultados condensados en la siguiente tabla:

Tabla 9. Cepas de actinobacterias y resultados de la amplificación.

Programa	Primers	M2F A3R	M2F A3R	M2F Sal 1r	M2F Sal 2r	Sal 1F Sal 1r	Sal 1F Sal 2r
		MICROM y MICROMm ¹	GORD	GORD	GORD	GORD	GORD
DNA							
28a56-3	<i>Verrucosipora</i>	+	+	+	-	-	-
DSM-44337	<i>V. gifhornensis</i> Y15523	+	+	+	-	-	-
e37	<i>Verrucosipora</i> AY360149	+	+	+	-	-	-
e80	<i>Verrucosipora</i> AY360150	+	+	+	-	+	-
AB18-a-032	<i>Verrucosipora</i>	+		+	+	-	-
BB-1	<i>Solwaraspora</i> EU714255	+	+	-	+	-	-
BC-1	<i>Solwaraspora</i> EU714256	+	+	+	+	+	+
AP-1	<i>Salinispora</i> FJ462365	+	+	+	-	-	+
AB-1	<i>Salinispora</i> EU714244	+	+	+	+	+	+
AN-1	<i>Salinispora</i> FJ462364	+	+	+	+	+	+
AQ-1	<i>Salinispora</i>	+		+	+	+	+
CNH-964	<i>S. arenicola</i> AY040623	+		-	+	-	-
CNH-536	<i>S. tropica</i> AY040618	+		-	-	+	-

+ : positivo, se obtuvo producto de PCR; - : negativo, no se obtuvo producto de PCR.

4.2.2.1 Programa *MICROM* y *MICROM* modificado.

Los oligos M2F y A3R fueron evaluados utilizando los programas *MICROM* y *MICROM* modificado para amplificar los DNAs obtenidos de las cepas de *Salinispora*, '*Solwaraspora*' y *Verrucosipora*. Estos oligos, descritos por Monciardini y colaboradores en 2002, tienen una temperatura óptima de alineamiento de 65° C por lo que la modificación de esta temperatura en el programa *MICROM* (60° C en el programa *MICROM*, 65° C en el programa *MICROM* modificado) se esperaba permitiera identificar alguna variación en la especificidad y selectividad para amplificar DNA de los grupos taxonómicos estudiados.

¹ *MICROMm*. Programa *MICROM* modificado, Tabla 6. Tanto el programa *MICROM* así como al cual se le modificó la temperatura de alineamiento mostraron dar una respuesta positiva para la amplificación utilizando el par de oligos específico para la familia *Micromonosporaceae*.

En cuanto a la temperatura, se ha sugerido utilizar temperaturas que estén 4° por debajo de la temperatura de fusión del DNA molde para obtener una hibridación adecuada. Si la temperatura es demasiado baja, el oligo se unirá inespecíficamente y si es demasiado alta, no se unirá siquiera a la secuencia blanco [Claros *et al.*, 2001].

Como bien se puede observar en la Figura 15 para el par de oligos M2F-A3R se obtiene un fragmento de amplificación de 1 000 bp para todas las muestras de trabajo utilizando el programa *MICROM*. Es decir, se obtiene el fragmento del peso molecular esperado [Monciardini *et al.*, 2002] y por lo tanto dan respuesta positiva. Igualmente, bajo las condiciones del programa *MICROM modificado* las muestras de trabajo mostraron respuesta positiva reflejada por medio del fragmento de 1 000 bp obtenido a pesar del cambio en la temperatura de alineamiento. De esta manera la temperatura de alineamiento utilizada no tuvo impacto en la especificidad de esta combinación de oligos pues se logró la amplificación de todas las cepas que corresponden a la familia *Micromonosporaceae*.

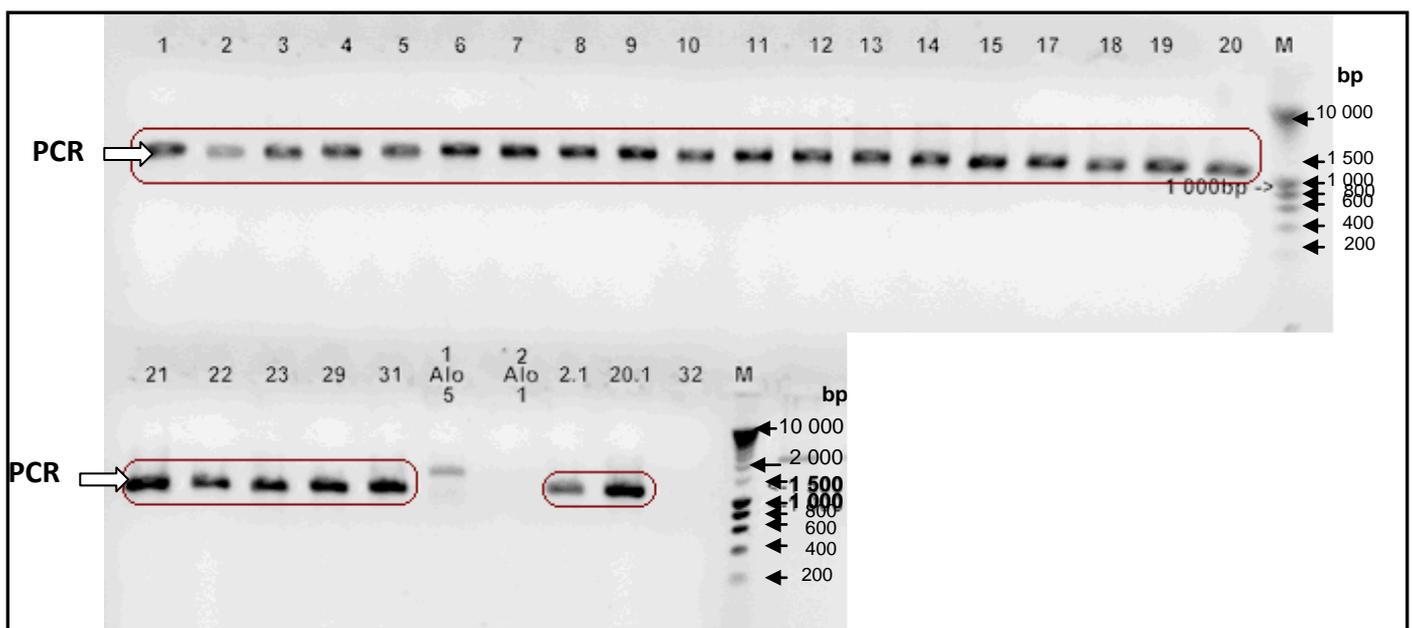


Fig. 15 Gel de agarosa donde se aprecia el producto de PCR obtenido para el par de oligos **M2F-A3R** para todas las muestras de DNA de trabajo utilizando el programa *MICROM*. Con esta combinación de oligos se espera un fragmento de amplificación de 1 000 bp [Monciardini *et al.*, 2002]. El orden de carga corresponde a: (1) 28a56-3, (2) *V. gifhornensis*, (3) e37, (6) BC1, (4) e80, (5) 28a56-3, (7) BB1, (8) AP1, (9) AB1, (10) AN1, (11) 28a-56-3, (12) *V. gifhornensis*, (13) e37, (14) e80, (15) AB18-a-032, (18)AB1, (19) AN1, (20) BB1, (21) BC1, (22) AP1, (23) AQ1, (29) CNH 964, (30) CNH 643, (31) CNH 536. Las muestras 1 Alo 5, 2 Alo 1, 2.1 y la muestra 20.1 fueron trabajadas bajo las condiciones de programa *MICROM modificado* utilizando el mismo par de oligos. El carril 32² corresponde al control negativo. El producto obtenido está encerrado en un recuadro. Condiciones de la electroforesis: 30 minutos, 100 V.

² Se utiliza el código 32 para la identificar el control negativo y la letra M para el marcador de peso molecular en las imágenes de los geles a partir de la Figura 15 en adelante.

El uso de estos oligos ya caracterizados y utilizados a su temperatura óptima reportada es un control positivo para determinar si el proceso se está efectuando adecuadamente, lo cual se aprecia en la exitosa amplificación para el DNA de las cepas de trabajo, las cuales corresponden a miembros de la familia *Micromonosporaceae*, grupo taxonómico blanco de los oligos.

4.2.2.2 Programa *GORD 68 45x3*.

Con el DNA extraído también se procedió a la evaluación de los juegos de oligos con el programa *GORD 68 45x3*. Bajo las condiciones de este programa la Figura 16a muestra ejemplos de los resultados para el par de oligos M2F-A3R, en tanto que la Figura 16b muestra los resultados para las muestras AB1, AN1, BC1 y AP1 con el juego M2F-Sal1r. Nuevamente, este último juego es utilizado a modo de control con las nuevas condiciones del programa *GORD*.

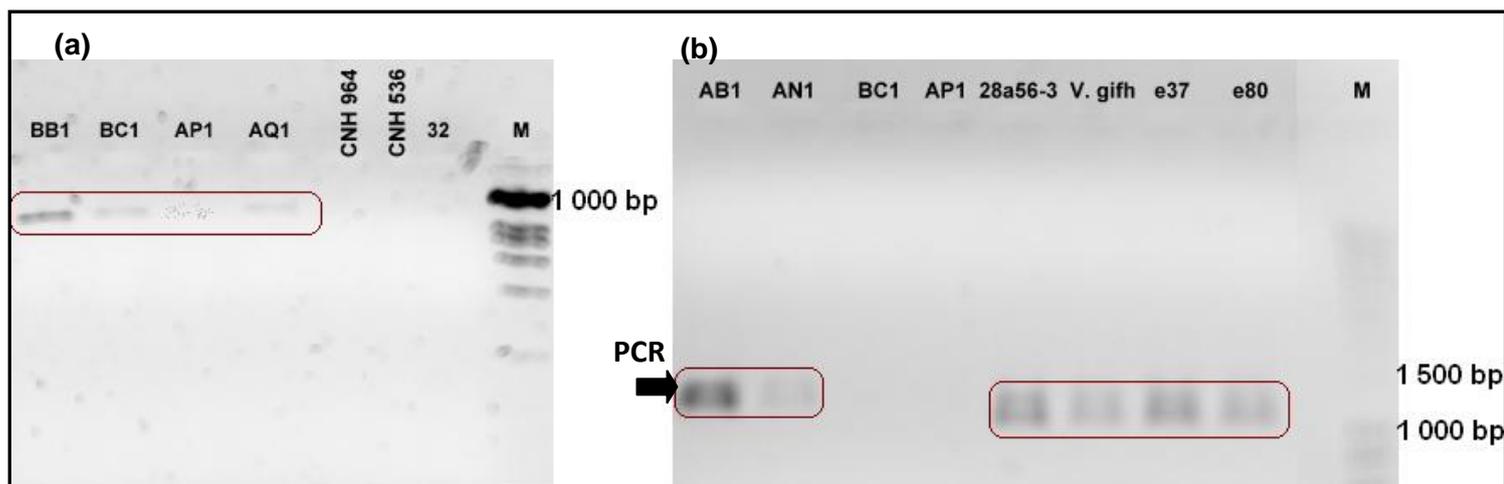


Fig. 16 (a) Resultado de la amplificación utilizando el juego de oligos **M2F-A3R**, donde se aprecia la obtención de un fragmento de amplificación de 1 000 bp. (b) Las muestras AB1, AN1, BC1 y AP1 son producto de amplificación a partir del juego de oligos **M2F-Sal1r** donde se aprecia un fragmento de 1 500 bp. Las muestras 28a56-3, *V. giffhornensis*, e37 y e80 corresponden a la amplificación obtenidos para el juego de oligos **M2F-A3R** donde se aprecia un fragmento con un peso molecular cercano a 1 000 bp bajo las condiciones del programa *GORD*. Condiciones de electroforesis: 30 minutos, 100 V.

En cuanto a los oligos M2F-A3R se obtuvieron fragmentos de peso molecular próximo a 1 000 bp, sin embargo, esto no fue constante para todas las muestras evaluadas. Se puede llegar a suponer que los cambios efectuados en la temperatura de alineamiento, superior en el caso del programa *GORD* en comparación con los programas *MICROM* y *MICROM modificado* (Tabla 6) afectaron la amplificación. Esto puede ser parcialmente correcto en especial para las cepas CNH 964 y para CNH 536 ya que ambas dieron respuesta negativa.

Sin embargo, para los casos de las cepas BB1 y AP1, considerando el duplicado del cual se tomó la alícuota de DNA para amplificar, adicionalmente podemos considerar que la concentración de éste quedó por debajo del límite de detección de los oligos. Retomando la Figura 14, para BB1 la muestra que da respuesta negativa es la correspondiente al carril 7 y para AP1 corresponde al carril 22. En la figura mencionada no se logra detectar con facilidad la banda que corresponde al DNA extraído de ambas cepas, por lo que, al menos para estas 2 cepas se puede sugerir que son falsos negativos.

Para el juego de oligos M2F-Sal1r, teniendo en cuenta los alineamientos realizados con ayuda del programa BLAST, recordamos que el oligo M2F va dirigido a una secuencia dentro del gen 16S rRNA en tanto que el oligo Sal1r está dirigido a un segmento en el espacio intergénico 16S-23S del operón rRNA. Comparativamente, el peso para el fragmento de M2F haciendo juego con A3R, cuya secuencia complementaria está dentro del mismo gen, es de 1 000 bp por lo que podemos inferir que el peso de M2F-Sal1r debe ser mayor como nos muestran los resultados: 1 500 bp (Figura 16b).

En el caso de este par de oligos (M2F-Sal1r) se observaron muestras en que uno de los duplicados da negativo y casos en que ambos dieron negativo. El argumento de la cantidad de DNA extraído resulta válido sólo para AP1 (Figura 14: carril 8 y 22) y CNH 536 (Figura 14: carril 31) con bandas de DNA muy tenues (baja concentración de DNA). Estas muestras dan respuesta negativa para esta combinación de oligos. Adicionalmente, el hecho de que estas cepas pertenezcan al género *Salinispora*, el blanco del oligo Sal1r, podría reforzar el creer que la cantidad de DNA está por debajo del límite de detección para este oligo. Cabe mencionarse que ambas muestras están proporcionando respuesta negativa al usar este oligo en combinación con otros, lo que da soporte a esta suposición.

Ahora bien, en cuanto a las cepas BC1, AB18-a-032 y e80 es interesante notar que están dando respuesta positiva a pesar de no ser miembros del género *Salinispora*. Esta respuesta puede deberse a la reacción con M2F que ha amplificado la región del gen 16S rRNA presente en la familia *Micromonosporaceae*. Esto podría explicar la poca intensidad de las bandas obtenidas como lo muestra la Figura 17 para la cepa e80 con un peso molecular ligeramente menor a 1 500 bp. Fuera de estos casos excepcionales, la combinación de oligos parece estar delimitando la respuesta positiva a cepas del género *Salinispora* (Tabla 9).

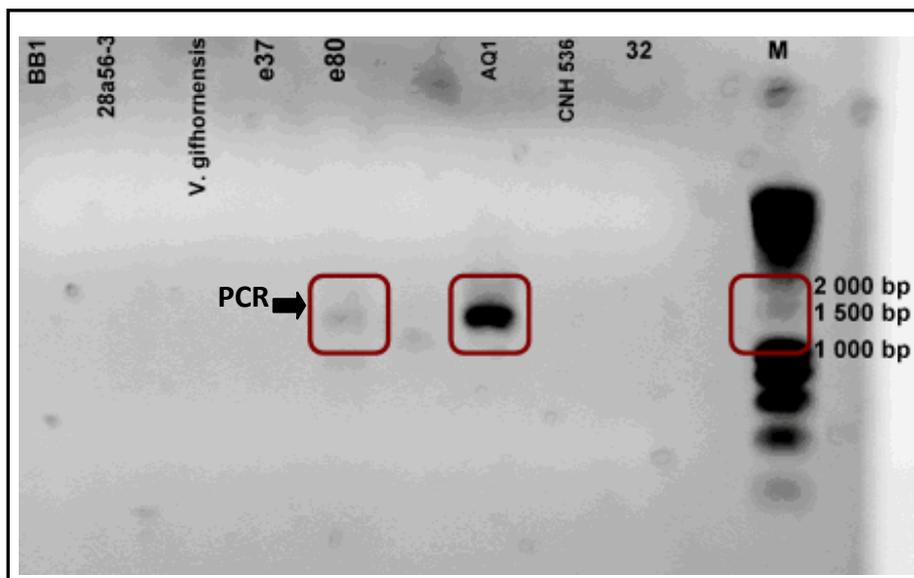


Fig. 17 Combinación de oligos: **M2F-Sal1r**. Géneros diferentes a *Salinispora* dan respuesta negativa a la amplificación con este par de oligos, en este gel la excepción es la cepa e80 que da respuesta positiva. AQ-1 es el único representante del género *Salinispora* en este gel, dando respuesta positiva con un fragmento de 1 500 bp. Condiciones de la electroforesis: 30 minutos, 100 V.

Para el par de oligos M2F-Sal2r podemos apreciar una mejor diferenciación entre géneros ya que se muestra una mejor discriminación entre cepas pertenecientes al género *Salinispora* con respecto a *Verrucosipora* y '*Solwaraspora*' dando negativos para todos ellos con excepción de BC1. Esta última pertenece al género '*Solwaraspora*', para quien la respuesta positiva se obtuvo para las dos muestras aunque por medio de una banda muy tenue (Figura 18). Igualmente, tenemos nuevamente la falta de amplificación de la muestra de la cepa AP1 correspondiente al carril 22 de la Figura 14 y destaca también la cepa CNH 964 quien dio respuesta negativa en contra de lo esperado.

Para la combinación Sal1F-Sal1r se obtuvo uniformemente una respuesta negativa por parte de todas las cepas de trabajo, como se aprecia en la Figura 19.

Finalmente, para el par de oligos Sal1F-Sal2r se aprecia una buena discriminación entre cepas del género *Salinispora* y *Verrucosipora* (Tabla 9). Aunque se puede mencionar que se aprecian falsos negativos para el caso de la cepa AP1, cuyo duplicado (carril 22 de la Figura 14) parece contener DNA por debajo del límite de detección de los oligos evaluados, como ya se ha sugerido. Igualmente es interesante notar que las cepas CNH 964 y CNH 536 que mostraron *in silico* coincidencia en el alineamiento de ese par de oligos en sus secuencias genéticas no hayan mostrado una respuesta positiva *in vitro*.

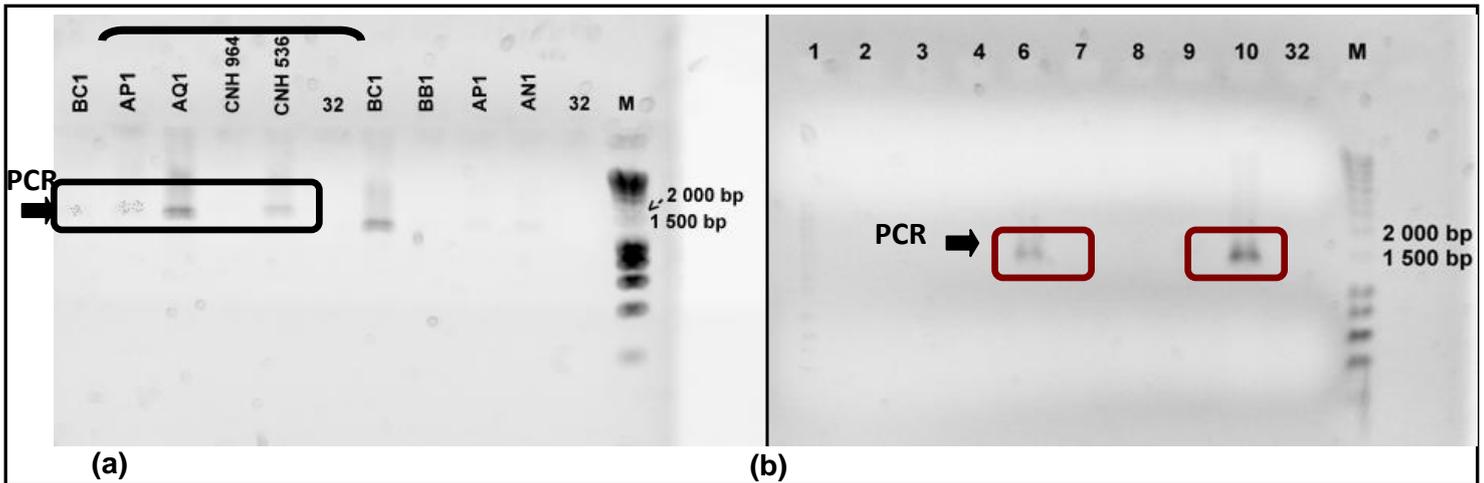


Fig. 18 (a) Encerrado en el recuadro oscuro está el producto de PCR obtenido al utilizar el par de oligos **M2F-Sal2r**. Respuesta positiva, con una banda de 1 500 bp, por parte de las cepas pertenecientes al género *Salinispora* exceptuando la tenue banda de BC1 (casi no se aprecia, resulta ser más tenue que la banda de AP1), correspondiente a *Solwaraspora*. El resto de los productos de PCR corresponden al uso de los oligos M2F-A3R (b) Encerrado en el recuadro oscuro está el producto de PCR obtenido al utilizar el juego de oligos **M2F-Sal2r**. Respuesta positiva en el carril 6 (BC1) y 10 (AN1), con bandas de 1 500 bp con el mismo par de oligos. Condiciones de la electroforesis: 30 minutos, 100 V.

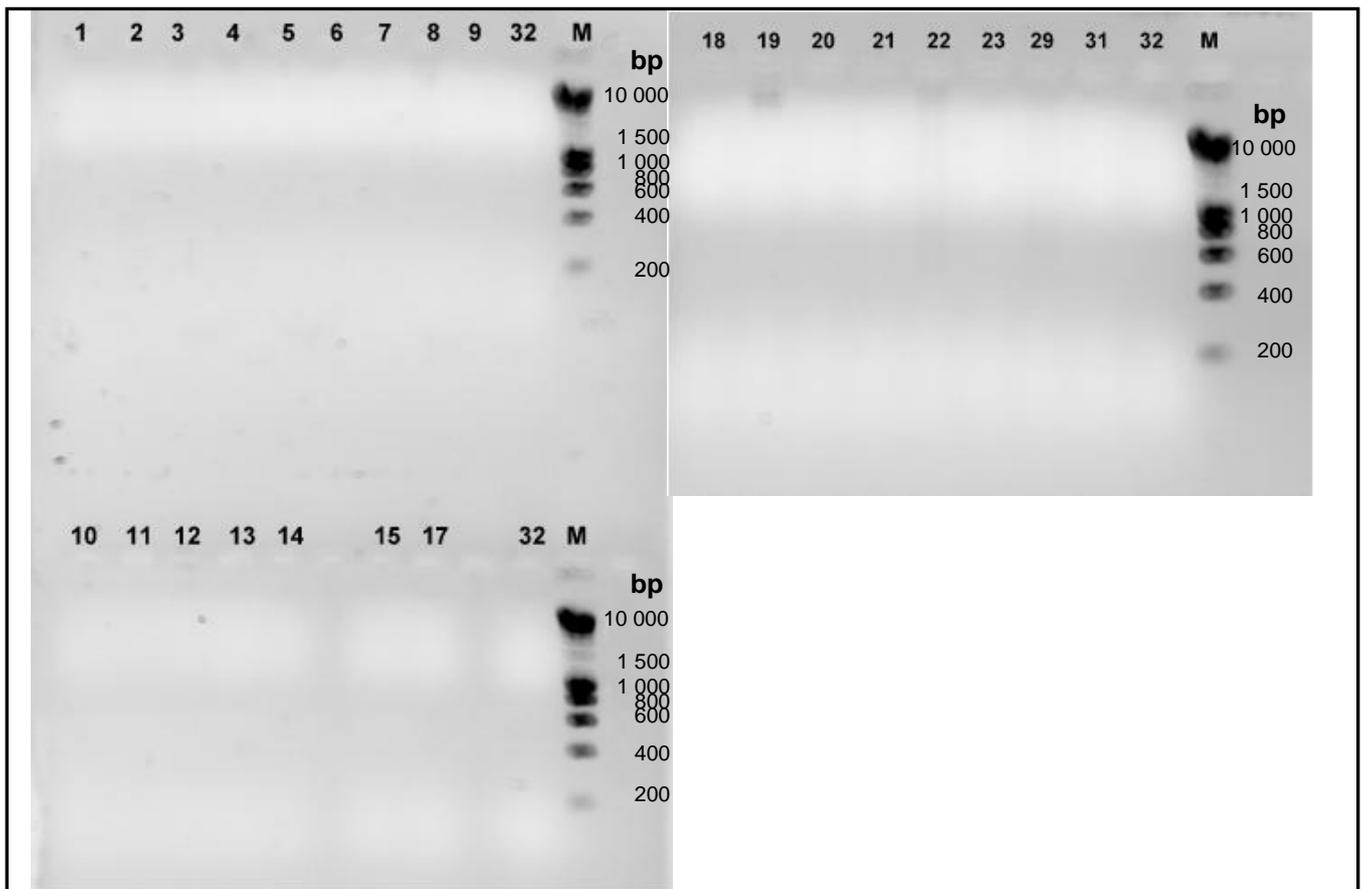


Fig. 19 Respuesta negativa de todas las cepas de trabajo ante el par de oligos **Sal1F-Sal1r**. El orden de carga corresponde a: (1) 28a56-3, (2) *V. gifhornensis*, (3) e37, (6) BC1, (4) e80, (5) 28a56-3, (7) BB1, (8) AP1, (9) AB1, (10) AN1, (11) 28a-56-3, (12) *V. gifhornensis*, (13) e37, (14) e80, (15) AB18-a-032, (18) AB1, (19) AN1, (20) BB1, (21) BC1, (22) AP1, (23) AQ1, (29) CNH 964, (30) CNH 643, (31) CNH 536, (32) control negativo, (M) marcador de peso molecular. Condiciones: 30 minutos, 100 V. Agarosa al 2%.

Es importante mencionar que no siempre es correcto pensar que la información obtenida *in silico* es totalmente cierta, aunque de la evaluación se hayan obtenido buenos valores (*E-value*, *Max score*, *Max identity*, etc.), ya que los resultados empíricos pueden no ser consistentes con éstos por diferentes motivos. Por ejemplo, si los oligos son muy cortos puede ocurrir que no se unan selectivamente al DNA blanco a la temperatura calculada, generando apareamientos imperfectos [Claros *et al.*, 2001].

5. CONCLUSIONES.

Gracias a las herramientas proporcionadas por la biología molecular es que se ha podido efectuar un mejor monitoreo no sólo de los ecosistemas terrestres sino también de los marinos. Han dado una gran contribución a la microbiología ambiental, entre otras cosas al haber desarrollado técnicas cultivo independientes que a su vez han dado como resultado la detección y el aislamiento de microorganismos obtenidos de diferentes fuentes naturales. Esto incluso ha dado pie al descubrimiento de nuevos grupos taxonómicos, a caracterizarlos fenotípicamente y también han ayudado al descubrimiento de nuevos compuestos naturales interesantes.

La adopción de técnicas basadas en la extracción y análisis de DNA a partir de muestras recuperadas de ecosistemas marinos ha sido muy relevante *per se* considerando la dificultad para la obtención de éstas y su manipulación. Adicionalmente estas técnicas también pueden ser complementarias a las técnicas microbiológicas tradicionales no sólo limitándose a ser métodos de detección e identificación sino como herramientas guía del aislamiento para el estudio y caracterización. Igualmente para guiar la aplicación de métodos selectivos, técnicas de enriquecimiento y diferenciación idóneas, importantes considerando que bacterias de rápido crecimiento soslayan el desarrollo de las actinobacterias en los cultivos obstaculizando su recuperación y estudio.

En la bioprospección estas técnicas también permiten la identificación de metabolitos secundarios de interés y mejorar su producción. Igualmente permiten identificar nuevos microorganismos o aquellos no cultivables, describir la distribución de microorganismos en diferentes hábitats, como los ecosistemas marinos, detectando aquellos que puedan ser explotables. Contribuyen también a la búsqueda dirigida de microorganismos y otros productos con valor económico actual o potencial.

Es entonces importante comprender que el desarrollo de la microbiología está ligado con el desarrollo de los métodos para la toma de muestra, recuperación, aislamiento, enriquecimiento y la manutención de los microorganismos en el laboratorio. Igualmente está vinculado con el desarrollo, evolución y mejora de técnicas bioquímicas, de biología molecular, de biotecnología, bioinformática y de la tecnología en general.

Se entiende pues la motivación que existe en torno al desarrollo y mejora de técnicas y herramientas que la microbiología ambiental necesita para optimizar el estudio y el entendimiento y de nuestro entorno. Así, el diseño de oligos específicos para un determinado grupo taxonómico utilizados para PCR es un punto importante para desarrollar, validar e implementar.

Basándonos entonces en los resultados obtenidos podemos sugerir que la especificidad de estos oligos por los géneros a los cuales van dirigidos es aceptable. Con esto demostramos que los oligos Sal1F, Sal1r y Sal2r (dirigidos a la región intergénica 16S-23S rRNA) mostraron buena especificidad *in silico* e *in vitro* para el género *Salinispora*, discriminándolo de manera aceptable del género *Verrucosipora*. Así también, los oligos V158F y 1063R mostraron muy buena especificidad *in silico* para el género *Verrucosipora*. Con esto podemos sugerirlos como herramientas para identificar a estos géneros por medio de PCR, probando con ello la hipótesis planteada para este proyecto.

Igualmente, con el desarrollo experimental de este trabajo se alcanzó el objetivo general de establecer estrategias de biología molecular basadas en PCR para la rápida detección de los géneros *Salinispora* y *Verrucosipora*, ambos pertenecientes a la familia *Micromonosporaceae*. De esto surgen los oligos trabajados y probados experimentalmente en especímenes aislados de sedimentos del Golfo de California. Con ello se propone un método alternativo para la identificación rápida que podrá ser aplicado a muestras ambientales, aprovechando las características particulares del gen 16S rRNA como el poseer regiones conservadas. La secuencia de la región intergénica 16S-23S rRNA también se perfila como una buena opción como blanco cuando la región 16S no presta la suficiente variación como para discriminar entre organismos estrechamente relacionados filogenéticamente, como el caso de los géneros *Micromonospora*, *Salinispora* y *Verrucosipora*.

De esta manera, con este trabajo se han evaluado oligos específicos para la detección por medio de PCR para el género *Salinispora* y oligos específicos para el género *Verrucosipora* de quienes a la fecha se han descrito formalmente pocas especies. Alcanzando satisfactoriamente los objetivos particulares del proyecto.

Estos oligos también pueden ayudar a corroborar la efectividad de las técnicas de aislamiento y recuperación de estos géneros de muestras ambientales a modo de control del proceso a fin de continuar con estudios de caracterización o bioprospección.

Este trabajo también pone en relieve la importancia que ha adquirido la bioinformática como parte del avance de las ciencias biológicas y como herramienta de apoyo y de análisis, igualmente optimizando tiempo y costos. Aunque también en ocasiones puede verse limitada, por ejemplo, por la falta de reportes de genomas completos.

Así entonces, para el diseño eficiente de oligos es bueno considerar el esquema de trabajo planteado por Stach y colaboradores en 2003:

- 1) Efectuar el diseño basado en regiones conservadas del genoma del grupo taxonómico de interés.
- 2) Evaluar *in silico*.
- 3) Evaluar con una serie de cepas tipo pertenecientes al grupo taxonómico de interés y también con cepas que no correspondan a éste.
- 4) Evaluar la especificidad *in situ*, es decir, en muestras ambientales.

Con todo lo anteriormente expuesto en este trabajo se puede concluir de manera puntual que:

- I. Se lograron evaluar satisfactoriamente oligos específicos para el género *Salinispora* mostrando buena respuesta *in vitro* para los aislados de sedimentos marinos recuperados del Golfo de California. Corroborando con ello los datos obtenidos mediante el BLAST para comparar *in silico* su especificidad por este género.
- II. La evaluación de los oligos para el género *Verrucosipora* no se llevó a cabo por término del proyecto previo al presente trabajo, sin embargo, de las pruebas *in silico* se puede apreciar que representan una buena propuesta para su desarrollo y completar su estudio en trabajos posteriores.
- III. De esta manera, las estrategias de biología molecular basadas en PCR propuestas se perfilan como una buena alternativa para una identificación rápida de estos miembros pertenecientes a la familia *Micromonosporaceae* con un gran potencial para ser aplicados en muestras ambientales.

-
- IV. Se prueba así que los oligos combinados: M2F-Sal1r, M2F-Sal2r y Sal1F-Sal2r son una propuesta útil para detectar de manera selectiva al género *Salinispora* discriminándolo con respecto al género *Verrucosispora*.

6. PERSPECTIVAS.

El entendimiento de la adaptabilidad de los microorganismos a diferentes ambientes como el marino, sus capacidades metabólicas para degradar biopolímeros recalcitrantes, sus relaciones con los demás organismos, sus relaciones evolutivas, los metabolitos secundarios que producen, entre otras muchas otras cuestiones motivan el desarrollo y mejora de técnicas y herramientas que la microbiología marina necesita para lograr que el estudio del ecosistema sea adecuado. Igualmente, la implementación y optimización de estas técnicas y herramientas son de gran relevancia pues contribuyen con el descubrimiento de nuevos grupos taxonómicos y en la adquisición de nuevos conocimientos.

Con todo lo mencionado, la PCR como parte de las herramientas que la biología molecular pone a nuestro alcance se nos presenta como una gran ayuda para el diagnóstico aplicable como adyuvante para la bioprospección. De modo que el uso de herramientas inadecuadas puede llevar a obtener conclusiones erradas como la subestimación de la verdadera biodiversidad presente en las muestras o la falta de capacidad para efectuar la detección adecuada de la microbiota.

Es muy probable que una gran diversidad microbiana aguarde ser descrita, especialmente en los océanos, ecosistemas sumamente bastos y complejos que podemos considerar como grandes moles incomprendidas que juegan a su vez un importante papel como parte mayoritario de la biósfera. Falta pues aún mucho por comprender sobre los ecosistemas marinos y su correlación con los microorganismos y viceversa, el rol que estos juegan en el medio ambiente y las diferencias que los caracterizan con respecto a sus contrapartes terrestres, entre otras cosas. Falta continuar con el avance de la bioprospección para su reconocimiento como recursos valiosos aplicables en la agricultura, la biorremediación o en biotecnología.

El diseño de estos oligos es una contribución a este entendimiento por lo que hay que reconocer que la respuesta favorable de éstos estará definida por la especificidad para tener mínima hibridación con DNA que no es el blanco y por la cobertura, es decir, que permita la amplificación para varios miembros del grupo taxonómico al cual va dirigido [Stach *et al.*, 2003]. Así que para completar este trabajo y afianzar la evaluación de estos oligos para ser aplicados a muestras ambientales se debería considerar completar el esquema de trabajo planteado por Stach y colaboradores en 2003.

7. RECOMENDACIONES.

- I. Incluir cepas del género *Micromonospora* en la evaluación para corroborar la discriminación entre los tres géneros, debido a su alta similitud en regiones del gen 16S.
- II. Trabajar diluciones de DNA a concentración conocida para determinar el límite de detección de los oligos y por lo tanto su sensibilidad.
- III. Finalmente se debe considerar efectuar la validación de estos oligos aplicándolos *in situ* en muestras ambientales, corroborando por secuenciación la detección específica de los grupos microbianos blanco de amplificación.
- VI. Igualmente, para determinar la temperatura óptima de alineamiento experimental se debe estudiar en un gradiente de temperatura.

De esta manera aseguraremos una respuesta totalmente satisfactoria con su aplicación en cualquier tipo de muestras, facilitando la detección de estos géneros bacterianos permitiéndonos acceder a nuevos conocimientos de interés para el área marina por la aparente biodiversidad de los géneros estudiados en este ecosistema.

8. REFERENCIAS.

- [1] Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.
- [2] Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K.-H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**:143-169.
- [3] Atlas, R. M. & Bartha, R. (1987) **Microbial Ecology, Fundamentals and Applications**, 2nd ed. The Benjamin/Cummings Publishing Co., USA; 283
- [4] Bonifaz, A. (2000) **Micología Médica Básica**, 2^a ed. Méndez Editores, México; 30-31, 143, 151, 437.
- [5] Bruce, K. D., Strike, P. & Ritchie, D. A. (1999) DNA Extraction from Natural Environments. **Environmental Monitoring of Bacteria**. Humana Press, USA; 97-107.
- [6] Buehler, L. K. & Rashidi, H. H. (2005) **Bioinformatics Basics. Applications in Biological Science and Medicine**, 2nd ed. Taylor & Francis Group, USA; 79-89.
- [7] Bull, A. T. & Stach, J. E. M. (2007) Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *TRENDS Microbiol.* **15**(11):491-499.
- [8] Camacho, A. & Fernández-Valiente, E. (2005) Un mundo dominado por los microorganismos. Ecología microbiana de los lagos antárticos. *Ecosistemas de la Asociación Española de Ecología Terrestre.* **14**(2):66-78.
- [9] Claros, M. G., Ávila, C., Gallardo, F. & Cánova, F. M. (2001) **Bioquímica Aplicada. Manual para el desarrollo de experimentos y el análisis de datos en bioquímica y biología molecular**. SEPTEM Ediciones. España; 282, 283.
- [10] Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N. & Ginsberg, H. S. (1996) **Tratado de Microbiología**, 4^o ed. Masson Editorial, España; 637.

-
- [11] Delgado, A., Menchero, S. P., Oliveras, S. A. & Martínez, M. (1994) **Laboratorio de Microbiología**. McGraw-Hill Interamericana, España; 228, 232.
- [12] Edwards, C. (1999) Some problems posed by Natural Environments for Monitoring Microorganisms. **Environmental Monitoring of Bacteria**. Humana Press, USA; 1-5.
- [13] Feling, R. H., Buchanan, G. O., Mincer, T. J., Kauffman, C. A., Jensen, P. R. & Fenical, W. (2003) Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **42**(3):355-357.
- [14] Fenical, W. & Jensen, P. R. (2006) Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nature Chem. Biol.* **2**(12):666-673.
- [15] Fiedler, H. P., Bruntner, C., Bull, A. T., Ward, A. C., Goodfellow, M., Potterat, O., Puder, C. & Mihm, G. (2005) Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie van Leeuwenhoek.* **87**:37-42.
- [16] Fiedler, H. P., Bruntner, C., Riedlinger, J., Bull, A. T., Knutsen, G., Goodfellow, M., Jones, A., Maldonado, L., Pathom-aree, W., Beil, W., Schneider, K., Keller, S. & Sussmuth, R. D. (2008) Proximicin A, B and C, novel aminofuran antibiotic and anticancer compounds isolated from marine strains of the actinomycete *Verrucosipora*. *J. Antibiotic (Tokyo)* **61**(3):158-163.
- [17] Fragoso-Yáñez, D. M. (2009) **Caracterización fenotípica y genotípica de bacterias gram (+) aisladas del pacífico mexicano**. Tesis de Licenciatura. UNAM, Facultad de Química. México, D. F.
- [18] Fortman, J. L., Magarvey, N. A. & Sherman, D. H. (2005) Something old, something new: ongoing studies of marine actinomycetes. *Proc SIM Abst S86*
- [19] Giovannoni, S. J. & Stingl, U. (2005) Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature.* **437**: 343-348.

-
- [20] Gobernado, M. & López-Hontangas, J. L. (2003) Identificación bacteriana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. **21**(Supl. 2):49-53.
- [21] Gontang, E. A., Fenical, W. & Jensen, P. R. (2007) Phylogenetic Diversity of Gram-Positive Bacteria Cultured from Marine Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(10):3272-3282.
- [22] Goodfellow, M. & Haynes, J. A. (1984) Actinomycetes in marine sediments. **Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes**. Academic Press, USA; 453-472.
- [23] Gracia-Gasca, A., Gío-Argáez, R. & Gaytán Caballero, A. (2007) El agua marina. *Revista Ciencia de la Academia Mexicana de Ciencia*. México. **58**(2)45-54.
- [24] Gutierrez-Lugo, M. T., Woldemichael, G. M., Singh, M. P., Suarez, P. A., Maiese, W. M., Montenegro, G. & Timmermann, B. N. (2005) Isolation of three new naturally occurring compounds from the culture of *Micromonospora* sp. P1068. *Nat. Prod. Res.* **19**:645-652.
- [25] Hamid, M. E., Maldonado, L., Sharaf Eldin, G. S., Mohamed, M. F., Saeed, N. S. & Goodfellow, M. (2001) *Nocardia africana* sp. nov., a new pathogen isolated from patients with pulmonary infections. *J. Clin. Microbiol.* **39**(2):625-630.
- [26] Han, S. K., Nedashkovskaya, O. I., Mikhailov, V. V., Kim, S. B. & Bae, K. S. (2003) *Salinibacterium amurskyense* gen. nov., sp. nov., a novel genus of the family *Microbacteriaceae* from the marine environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:2061–2066.
- [27] He, H., Ding, W.-D., Bernan, V. S., Richardson, A. D., Ireland, C. M. & Greenstein, M. (2001) Lomaivitivins A and B, potent antitumor antibiotic from *Micromonospora lomaivitensis*. *J. Am. Chem. Soc.* **123**:5362-5363
- [28] Head, I. M. (2004) Recovery and Analysis of Ribosomal RNA Sequences from the Environment. **Ecology Manual**. 2^o ed. Kluwer Academic Publisher, USA; 139-142.

-
- [29] Helmke, E., & Weyland, H. (1984) *Rhodococcus marinonescens* sp. nov., an actinomycete from the sea. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**:127–138.
- [30] Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K. & Wellington, E. M. H. (1997) Analysis of Actinomycetes by Specific Amplification of Genes Encoding 16S rRNA and Gel-Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(8):3233-3241.
- [31] Hugenholtz, P., Goebel, B. M. & Pace, N. R. (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* **180**:4765-4774
- [32] Jeanthon, C., L'Haridon, S., Cueff, V., Banta, A, Reysenbach, A.-L. & Prieur, D. (2002) *Thermodesulfobacterium hydrogeniphilum* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent at Guaymas Basin, and emendation of the genus *Thermodesulfobacterium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:765-772.
- [33] Jensen, P. R., Mincer, T. J., Williams, P. G. & Fenical, W. (2005a) Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **87**(1):43-48.
- [34] Jensen, P. R., Gontang, E., Mafnas, C., Mincer, T. J. & Fenical, W. (2005b) Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environ. Microbiol.* **7**(7):1039-1048.
- [35] Jensen, P. R. & Mafnas, C. (2006) Biogeography of the marine actinomycete *Salinispora*. *Environ. Microbiol.* **6**(11):1881-1888.
- [36] Jensen, P. R, Williams, P. G., Oh, D.-C., Zeigler, L. & Fenical, W. (2007) Species-Specific Secondary Metabolite Production in Marine Actinomycetes of the Genus *Salinispora*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**(4):1146-1152.
- [37] Kim, T. K., Garson, M. J. & Fuerst, J. A. (2005) Marine actinomycetes related to the 'Salinispora' group from the Great Barrier Reef sponge *Pseudoceratina clavata*. *Environ. Microbiol.* **7**(4):509-518.

-
- [38] Kim, T. K., Hewavitharana, A. K., Shaw, P. N. & Fuerst, J. A. (2006) Discovery of a New Source of Rifamycin Antibiotics in Marine Sponge Actinobacteria by Phylogenetic Prediction. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(3):2118-2125.
- [39] Koolman, J. & Röhm, K.-H. (2004) **Bioquímica. Texto y Atlas**. 3^o ed. Editorial Médica Panamericana, España; 258, 262, 264.
- [40] Kwon, H. C., Kauffman, C. A., Jensen, P. R. & Fenical, W. (2006) Marinomycins A-D, antitumor-antibiotics of new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus “*Marinispora*”. *J. Am. Chem. Soc.* **128**:1622-1632.
- [41] Lacey, J. & Crook, B. (1988). Fungal and actinomycete spores as pollutants of the workplace and occupational allergens. *An. Occ. Hygiene* **32**:515–633.
- [42] Lam, K. S. (2006) Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *C. Op. Microbiol.* **9**:245-251.
- [43] Loke, P. & Sim, T. S. (2006) *Applications of Bioinformatics and Biocomputing to Microbiological Research*. **Microbial Biotechnology, Principles and Applications**, 2nd ed. World Scientific Publishing Co., Singapore; 182-184, 193-1997.
- [44] Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. (2004) **Brock. Biología de los microorganismos**, 10^o ed. Pearson Prentice Hall, España; 302-305, 307-308, 312-314.
- [45] Madigan, M. T. & Martinko, J. M. (2006) **Brock. Biology of Microorganisms**, 11th ed. Pearson Prentice Hall, USA; 386, 391.
- [46] Magarvey, N. A., Keller, J. M., Bernan, V., Dworkin, M. & Sherman, D. H. (2004) Isolation and Characterization of Novel Marine-Derived Actinomycete Taxa Rich in Bioactive Metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(12):7520-7529.
- [47] Maldonado, L. A. (2002) **Polyphasic taxonomy of members of the genus *Nocardia***. Ph.D. Thesis, University of Newcastle, Newcastle upon Tyne, England; 28.

-
- [48] Maldonado, L. A. (2007) Un grupo bacteriano provee 70% de antibióticos. *La Jornada*, México, D.F. Año 23, número 8250. En internet:
<http://www.jornada.unam.mx/2007/08/09/index.php?section=ciencias&article=a03n2cie>
- [49] Maldonado, L. A., Fenical, W., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., Mincer, T. J., Ward, A. C., Bull, A. T. & Goodfellow, M. (2005a) *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**:1759-1766.
- [50] 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
- [51] Maldonado, L. A., Fragoso-Yáñez, D., Pérez-García, A., Rosellón-Druker, J. & Quintana, E. T. (2008) Actinobacterial Diversity from marine sediments collected in Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek.* **95**(2):111-120.
- [52] McCarthy, A. J. (1987) Lignocellulose-degrading actinomycetes. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**:145-163.
- [53] Mincer, T. J., Jensen, P. R., Kauffman, C. A. & Fenical, W. (2002) Widespread and Persistent Population of a Major New Marine Actinomycete Taxon in Ocean Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(10):5005-5011.
- [54] Monciardini, P., Sosio, M., Cavaletti, L., Chiocchini, C. & Donadio, S. (2002) New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes. *FEMS Microbiol Ecol.* **42**: 419-429.
- [55] Moran, M. A., Rutherford, L. T. & Hodson, R. E. (1995). Evidence for indigenous *Streptomyces* populations in a marine environment determined with a 16S rRNA probe. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3695–3700.
- [56] Okazaki, T., Kitahara, T. & Okami, Y. (1975) Marine microorganisms. IV. A new antibiotic SS-228 Y produced by *Chainia* isolated from shallow sea mud. *J Antibiot. (Tokyo)* **28**:176–184

-
- [57] Pathom-aree, W., Stach, J. E., Ward, A. C., Horikoshi, K., Bull, A. T. & Goodfellow, M. (2006) Diversity of actinomycetes isolated from the Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles* **10**(3), 181–189.
- [58] Pelczar, M., Chan, E. & Krieg, N. (1993) **Microbiology. Concepts and Applications**, McGraw-Hill, USA; 809, 881.
- [59] Prudhomme, J., McDaniel, E., Ponts, N., Bertani, S., Fenical, W., Jensen, P. & Le Roch, K. (2008) Marine Actinomycetes: A New Source of Compounds against the Human Malaria Parasite. *PLoS ONE*. **3**(6):1-8
- [60] Qiu, D., Ruan, J. & Huang, Y. (2008) Selective Isolation and Rapid Identification of Members of the Genus *Micromonospora*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**(17):5593-5597.
- [61] Quintana, R. 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*. **93**:305-313.
- [62] Rheims, H., Schuman, P., Rohde, M. & Stackebrandt, E. (1998) *Verrucosispora gifhornensis* gen. nov., sp. nov., a new member of the actinobacterial family *Micromonosporaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:1119-1127.
- [63] Riedlinger, J., Reicke, A., Zähler, H., Krismer, B., Bull, A. T., Maldonado, L. A., Ward, A. C., Goodfellow, M., Bistger, B., Bischoff, D., Süßmuth, R. D. & Fiedler, H. P. (2004) Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucosispora* strain AB-18-032. *J. Antibiot. (Tokyo)* **54**(4):271-279.
- [64] Rintala, H., Nevalainen, A., Rönkän, E. & Suutari, M. (2001) PCR primers targeting the 16S rRNA gene for specific detection of streptomycetes. *Mol. Cell. Prob.* **15**:337-347.
- [65] Rosellón-Druker, J. M. H. (2008) **Estudios comparativos de miembros del género *Streptomyces* aislados de sedimentos marinos del Golfo de California**. Tesis de Licenciatura. UNAM, Facultad de Ciencias. México, D. F.

-
- [66] Rusnak, K., Troyanovich, R., Mierzwa, R., Chu, M., Patel, M. & Weinstein, M. (2001) An antibiotic with activity against gram-positive bacteria from the gentamicin-producing strain of *Micromonospora purpurea*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**:502-503.
- [67] Stach, J. E. M., Maldonado, L. A., Ward, A. C., Goodfellow, M. & Bull, A. T. (2003) New primers for the class *Actinobacteria*: application to marine and terrestrial environments. *Environ. Microbiol.* **5**(10):828-841.
- [68] Stackebrandt, E., Rainey, F. A. & Ward-Rainey, N. L. (1997) Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:479-491.
- [69] Stenesh, J. (1989) **Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology**. 2^o ed. Wiley Interscience Publication, USA; 181, 337.
- [70] 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". *PNAS.* **103**(32):12115-12120.
- [71] Trujillo, M. E. & Goodfellow, M. (1997) Polyphasic taxonomic study of clinically significant *Actinomadura* including the description of *Actinomadura latina* sp. nov. *Zentralbl. Bakteri.* **285**(2):212-233.
- [72] Watve, M. G., Tickoo, R., Jog, M. M. & Bhole, B. D. (2001) How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch. Microbiol.* **176**:386-390
- [73] Weaver, R. F. (2008) **Molecular Biology**. 4^o ed. McGraw Hill Higher Education, USA; 817, 818.
- [74] Weyland, H. (1969) Actinomycetes in North Sea and Atlantic Ocean Sediments. *Nature.* **223**:8208.
- [75] Whitman, W. B., Coleman, D. C. & Wiebe, W. J. (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **95**:6578-6583.

-
- [76] Williams, P. G. (2008) Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. *Trends Biotechnol.* **27**(1):45-52.
- [77] Woese, C. R. (1987) Bacterial Evolution. *Microbiol. Rev.* **51**(2):221-271
- [78] Zhang, Z., Wang, Y. & Ruan, J. (1997) A proposal to revive the genus *Kitasatospora* (Omura, Takahashi, Iwai and Tanaka 1982). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**(4):1048-1054.
- [79] Zhang, Z., Kudo, T., Nakajima, Y. & Wang Y. (2001) Clarification of the relationship between the members of the family *Thermomonosporaceae* on the basis of 16S rDNA, 16S-23S rRNA internal transcribed spacer and 23S rDNA sequences and chemotaxonomic analyses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:373-383.

*“Una búsqueda comienza siempre primero
con la suerte del principiante y termina
con la prueba del conquistador.”*

-Paulo Coelho