



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA Y QUITINOLÍTICA  
POR AISLADOS BACTERIANOS DE SEDIMENTOS MARINOS  
DEL GOLFO DE CALIFORNIA**

**TESIS:  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA:  
GABRIELA VELÁZQUEZ BUSTOS**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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:** Rodolfo Pastelín Palacios

**VOCAL:** Hermilo Leal Lara

**SECRETARIO:** Luis Ángel Maldonado Manjarrez

**1er. SUPLENTE:** Euclides Ávila Chávez

**2° SUPLENTE:** Beatriz Ruiz Villafán

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO.**

---

**ASESOR DEL TEMA**

**Luis Ángel Maldonado Manjarrez**

---

**SUSTENTANTE:**

**Gabriela Velázquez Bustos**

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias mamá, gracias papá por todo su apoyo, amor y cariño durante toda mi vida y por hacer de mi una persona de bien.

Hermano, porque eres parte fundamental de mi vida.

A mis cuatro maravillosos abuelos que día a día estuvieron y están al pendiente de mí de los cuales solo he recibido consejos, amor, confianza, cuidados y apoyo, por lo que les estaré eternamente agradecida.

A mis amigos porque juntos disfrutamos, aprendimos, y vivimos muchas experiencias inolvidables.

Luis gracias por la oportunidad y el apoyo para conmigo, por tu enseñanza dedicación e interés durante mi estancia en tu laboratorio.

Al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología por la obtención de muestras provenientes del Pacífico mexicano así como por el uso de las instalaciones y buques oceanográficos.

# ÍNDICE

	Páginas
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
ANTECEDENTES.....	3
Polisacáridos, celulosa, mecanismo de degradación de celulosa, quitina, mecanismo de degradación de quitina , clase actinobacteria	
OBJETIVO.....	19
HIPÓTESIS.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
Recursos microbianos	
PROCEDIMIENTO.....	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
BIBLIOGRAFÍA.....	37

## RESUMEN

Las enzimas celulolíticas y quitinolíticas constituyen un mercado con potencial en el área biotecnológica de la industria de alimentos. Existe un gran interés por utilizar residuos de celulosa y quitina para diversos procesos industriales ya que su uso permitiría convertir productos de bajo costo en productos de alto valor comercial. Actualmente la mayoría de este tipo de enzimas ha sido aisladas de hongos, sin embargo existen diversas bacterias que también las presentan, teniendo como ventaja que su tiempo de crecimiento es menor y constituyen una alternativa para la búsqueda de dichas enzimas e incluyendo la posibilidad de ser nuevas. El presente trabajo tiene como finalidad evaluar el potencial celulolítico y quitinolítico de algunos géneros microbianos de la clase *Actinobacteria* identificados previamente; aislados del Golfo de California. Se evaluaron pruebas de degradación en medios sólidos preparados tanto con agua bidestilada como con agua marina y suplementados con celulosa o quitina, respectivamente. La presencia de halos en los medios sólidos indicó la degradación de estos polisacáridos. Los cinco géneros evaluados, es decir, *Micromonospora*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Salinispora* y *Streptomyces* presentaron actividad celulo- y/o quitinolítica tanto en medios sin como con 3.5% de sal marina, lo que semeja las condiciones naturales de los microorganismos aislados. Los resultados indican que algunos de los microorganismos evaluados tienen una importante actividad tanto celulo- y quitinolítica representando un grupo de bacterias importante como fuente de enzimas de posible utilidad en la industria, en particular la de alimentos.

**Palabras clave:** Actividad celulolítica, actividad quitinolítica, actinomicetos.

## INTRODUCCIÓN

Existe un gran interés por utilizar residuos de celulosa y quitina para diversos procesos industriales ya que su uso permitiría convertir productos de bajo costo en productos de alto valor comercial. Actualmente la mayoría de las enzimas celulolíticas y quitinolíticas son aisladas de hongos, pero existen diversas bacterias que también las presentan teniendo como ventaja que su tiempo de crecimiento es menor y constituyen una alternativa para la búsqueda de dichas enzimas e incluso nuevas.

Las enzimas celulolíticas y quitinolíticas juegan un papel importante en diferentes industrias tales como: la de los detergentes, la papelera, la textil y la alimentaria; pues son compuestos de interés para uso en la industria de aceites esenciales y comestibles, el mejoramiento de la producción de jugos de fruta o de vegetales, la extracción de pigmentos, saborizantes y aromas entre otros.

Dada la creciente demanda en los procesos de extracción de diversos productos los preparados enzimáticos representan un aspecto crucial aún poco explorado a profundidad, pero imprescindible para la biotecnología.

En el presente proyecto se evaluó la actividad celulolítica y quitinolítica de bacterias de la clase *Actinobacteria* aisladas de sedimentos marinos del Golfo de California con el fin de encontrar candidatos bacterianos de utilidad para su futura aplicación en la industria, sobre todo la de alimentos.

## **ANTECEDENTES**

### **Los Polisacáridos.**

Polisacáridos simples como complejos se encuentran de manera abundante en la naturaleza y son una fuente de energía lista para algunos microorganismos. Los polisacáridos son cadenas largas de monosacáridos (azúcares) unidos por enlaces glucosídicos. El almidón, el glucógeno y la celulosa son polisacáridos de alto peso molecular (de más de 1,000,000 daltons) compuestos por glucosa, pero difieren en los enlaces entre unidades de azúcar.

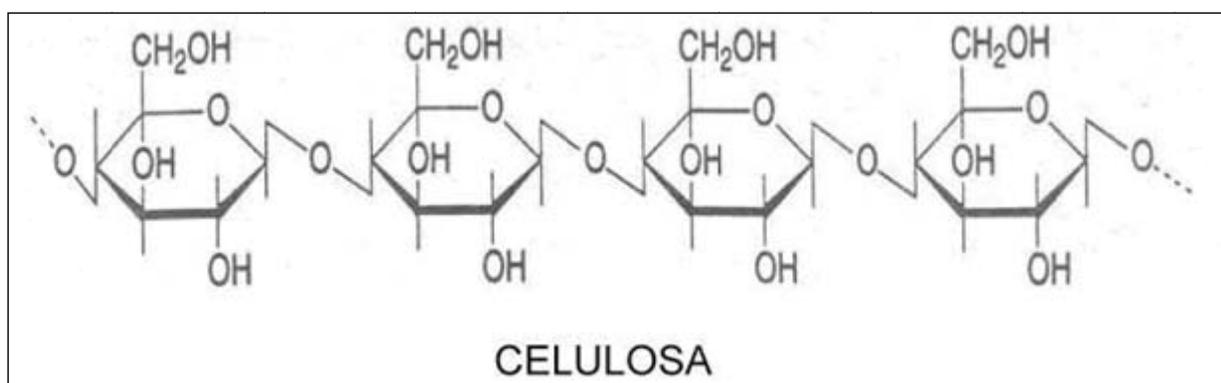
Químicamente el almidón y el glucógeno son moléculas fácilmente degradadas por enzimas. Estos además son un buen material de almacenaje energético. La celulosa constituye el material estructural principal de las plantas. Los xilanos, son componentes estructurales de las plantas y son considerados polímeros heterogéneos porque estos contienen pequeñas cantidades de hexosas La quitina es también un polímero formado por unidades de *N*-acetilglucosamina con puentes de hidrógeno entre las cadenas largas.

### **La Celulosa.**

El producto de biosíntesis más abundante presente en la tierra es la celulosa, este es el mayor constituyente de las plantas a pesar de ser sintetizado por un número limitado de especies bacterianas como *Acetobacter xylinium* y *Sarcina ventriculi*. Los hongos y las bacterias son los principales degradadores de celulosa en la naturaleza. Los hongos funcionan mayormente en suelos acidificados y madera, donde la celulosa está protegida de ataques enzimáticos por lignina. Estos organismos son instrumentos de

despolimerización y mineralización de la celulosa. Respecto a las bacterias, las aeróbicas que descomponen celulosa incluyen los géneros *Myxobacteria*, *Cytophaga*, *Sporocytophaga*. En relación a las bacterias anaerobias los *clostridia* utilizan la celulosa vía fermentativa.

La celulosa (Figura 1) es un homopolisacárido lineal de unidades *D*-glucopirinosas en donde los monómeros se encuentran unidos mediante enlaces glucosídicos  $\beta$ -(1,4). El peso molecular de la celulosa puede llegar a ser hasta de varios millones de daltons y su alta resistencia mecánica y química se debe a que sus cadenas paralelas se alinean sobre un eje longitudinal lo que le permite establecer un gran número de puentes de hidrógeno intermoleculares y que da origen a microfibrillas altamente estructuradas con zonas cristalinas y amorfas. A pesar de tener muchos hidroxilos libres es muy poco soluble en agua. Lo anterior se debe a que sus grupos hidroxilos no se hidratan por estar interactuando entre sí (Badui, 2006).



**Figura 1.** Estructura química de la celulosa (polímero de glucosa).  
Adaptado de Moat *et al.*, 2002.

Algunos microorganismos degradadores de celulosa atacan los polímeros de alto peso molecular de las paredes celulares de las plantas usando un complejo de enzimas extracelulares llamadas celulosomas. Esta multiproteína se une por el complejo de proteína "scaffold" (del inglés) llamada scaffoldin (del inglés) la cual es adjuntada a la superficie exterior de la célula bacteriana por una proteína anclada. Unido a las proteínas scaffold extendidas hay varios tipos de enzimas glicosidasas que atacan la celulosa (endoglucanasas y celobiohidranasas). Este multicomplejo enzimático degradador de celulosa provee eficiencia en la degradación del polímero de la pared celular de las plantas, mientras que mejora la obtención de monómeros y pequeños oligómeros en la célula debido a su cercana relación con la célula.

Las endonucleasas responsables de la degradación de celulosa, producen celobiosa y glucosa. Estos productos restringen la síntesis de las endonucleasas, en una relación lenta en el proceso.

Las industrias que tienen interés en la conversión de celulosa a glucosa a gran escala deben tomar en cuenta esta restricción para incrementar su eficiencia. La producción de glucosa de las fuentes abundantes de celulosa disponible es de considerable interés, ya que la glucosa liberada puede ser fermentada a etanol.

La celulosa constituye una fuente de glucosa prácticamente inagotable que se renueva de forma continua al mejorar o desarrollar nuevos procesos. Los científicos han desarrollado muchas investigaciones para aprovecharlas como una forma alternativa de obtención de glucosa.

En contraste y a diferencia de los animales monogástricos, los herbívoros son los únicos capaces de aprovechar la celulosa en su metabolismo, pues cuentan con las

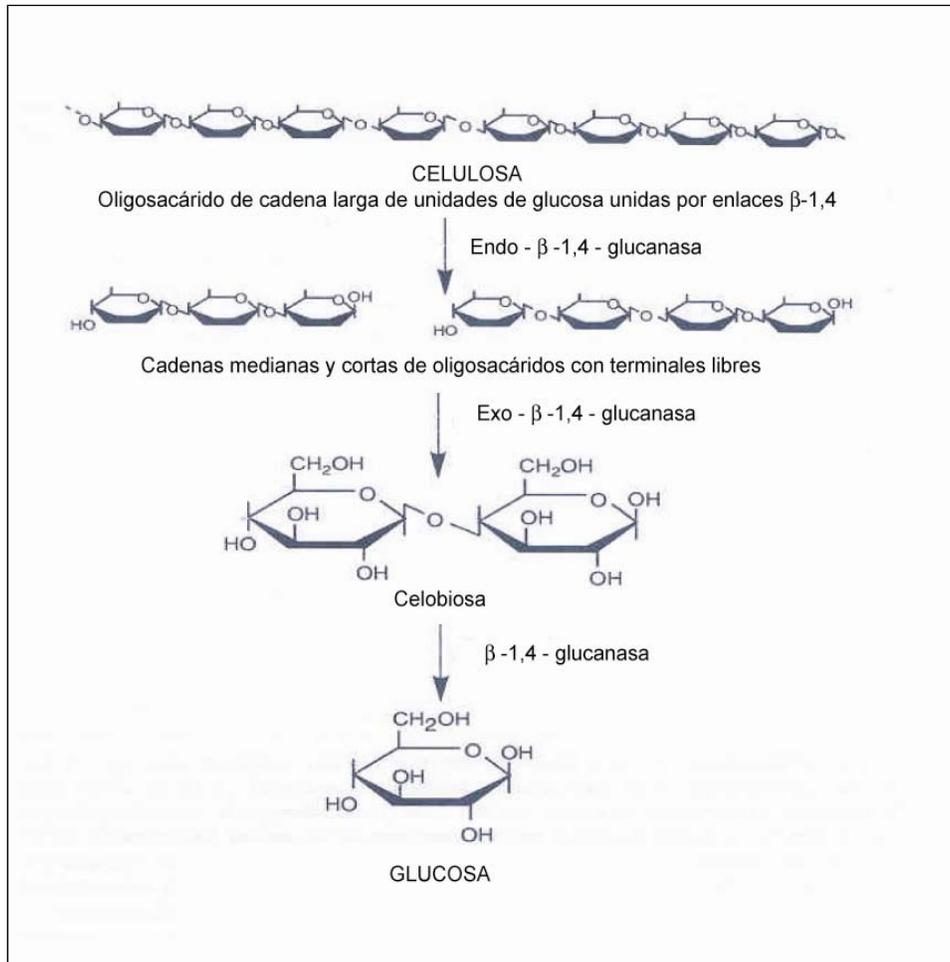
correspondientes enzimas celulasas en el tracto gastrointestinal mientras que para el ser humano la celulosa es parte de la fibra cruda.

Las celulasas son un sistema complejo de enzimas que hidrolizan las uniones  $\beta$ -(1,4) de los glucanos y se encuentran distribuidas en la naturaleza. Las preparaciones comerciales provienen principalmente de los hongos *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger* (Badui, 2006). Sin embargo, es de esperarse que otros microorganismos (en particular las bacterias) presentes en la naturaleza también cuenten con este tipo de enzimas capaces de degradar este abundante polisacárido.

### **Mecanismo de degradación de la celulosa.**

Para que se lleve a cabo la degradación de la celulosa se requiere de la actividad de tres enzimas:

- a) Inicialmente la  $\beta$ -endo glucanasa que actúa en los enlaces  $\beta$ - glucosídicos de las glucosas que forman la celulosa.
- b) Después la enzima exo- $\beta$ -1,4-glucanasa que corta la cadena  $\beta$ -1,4 del *D*-glucano a partir del extremo no reductor de la molécula reduciendo las unidades a celobiosa,
- c) Finalmente la celobiosa es reducida a glucosa por la enzima  $\beta$  -1,4-glucosidasa (Figura 2).



**Figura 2.** Degradación enzimática de la celulosa.  
Adaptado de Moat *et al.*, 2002.

Las enzimas celulolíticas son producidas extracelularmente por organismos como *Trichoderma* (Dominio Eukarya) y *Celulomonas*, *Micromonospora*, y *Thermomonospora* (Dominio Bacteria); estos últimos tres, del orden de los *Actinomycetales* (Moat *et al.*, 2002).

## La Quitina

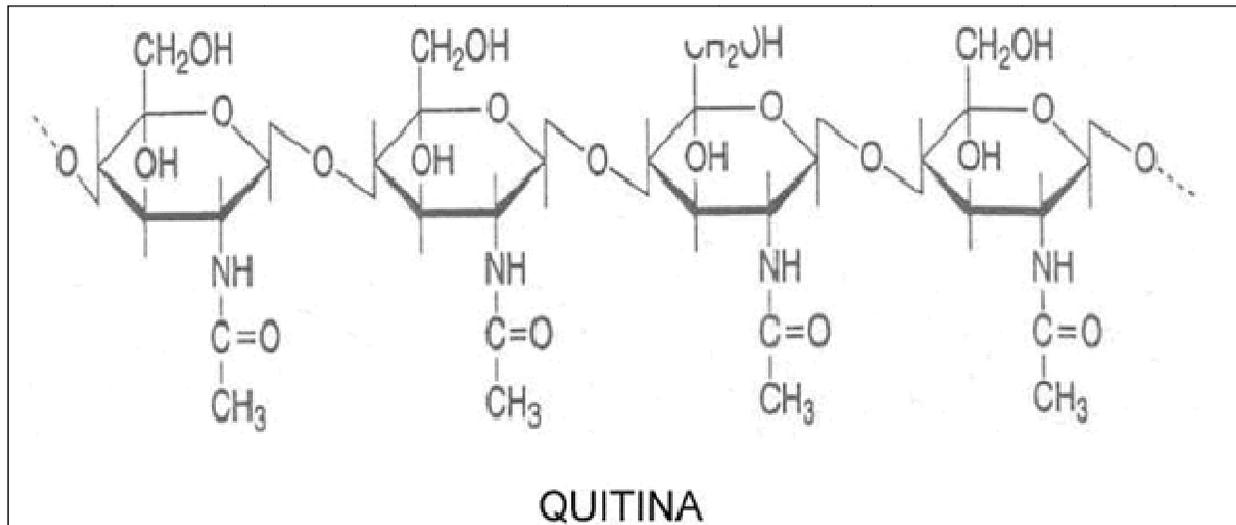
El mayor constituyente de las paredes celulares de algunas plantas y animales selectos es la quitina. Muchos hongos poseen quitina como componente de la pared celular y esta está presente en los caparazones de los crustáceos (langosta, camarones y cangrejos). La quitina también forma parte del cuerpo externo de los saltamontes, escarabajos, cucarachas y otros insectos. Es un polímero estable de unidades de *N*-acetilglucosamina (NAG) unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos (Figura 3). Su estabilidad es derivada de los puentes de hidrógeno entre las cadenas adyacentes a través de su residuo *N*-acetilo. La amplia presencia de quitina en suelo y ambientes acuáticos ha conducido a la evolución de una amplia variedad de microorganismos que pueden descomponer esta sustancia.

Miembros de la clase *Actinobacteria* (bacterias filamentosas) son los mayores degradadores de quitina. La adición de quitina como sustrato en un medio enriquecido ha dado consistentemente resultado en el aislamiento de diversas actinobacterias (Maldonado, comunicación personal). En hábitats acuáticos otras bacterias están involucradas en la degradación de quitina. Por ejemplo, el género *Vibrio*.

Muchas especies de estas y bacterias marinas relacionadas, son capaces de degradar quitina, la cual encuentran en la columna acuática, en los sedimentos marinos y los crustáceos depositados en él cuando éstos mueren, así como cuando construyen sus exoesqueletos.

Después de la celulosa, la quitina es el polímero que se encuentra en mayor abundancia en la naturaleza y comparte una estructura extremadamente similar a la de la celulosa. Su composición química está basada en aminoazúcares, la *N*-acetil-*D*-glucosamina (NAG), que se unen linealmente mediante enlaces  $\beta$ -(1,4), como lo hace

la glucosa en las estructuras fibrilares y cristalinas de la celulosa (Badui, 2006). Los actinomicetos son los procariones degradadores de quitina más notables (González-Franco, 2003).

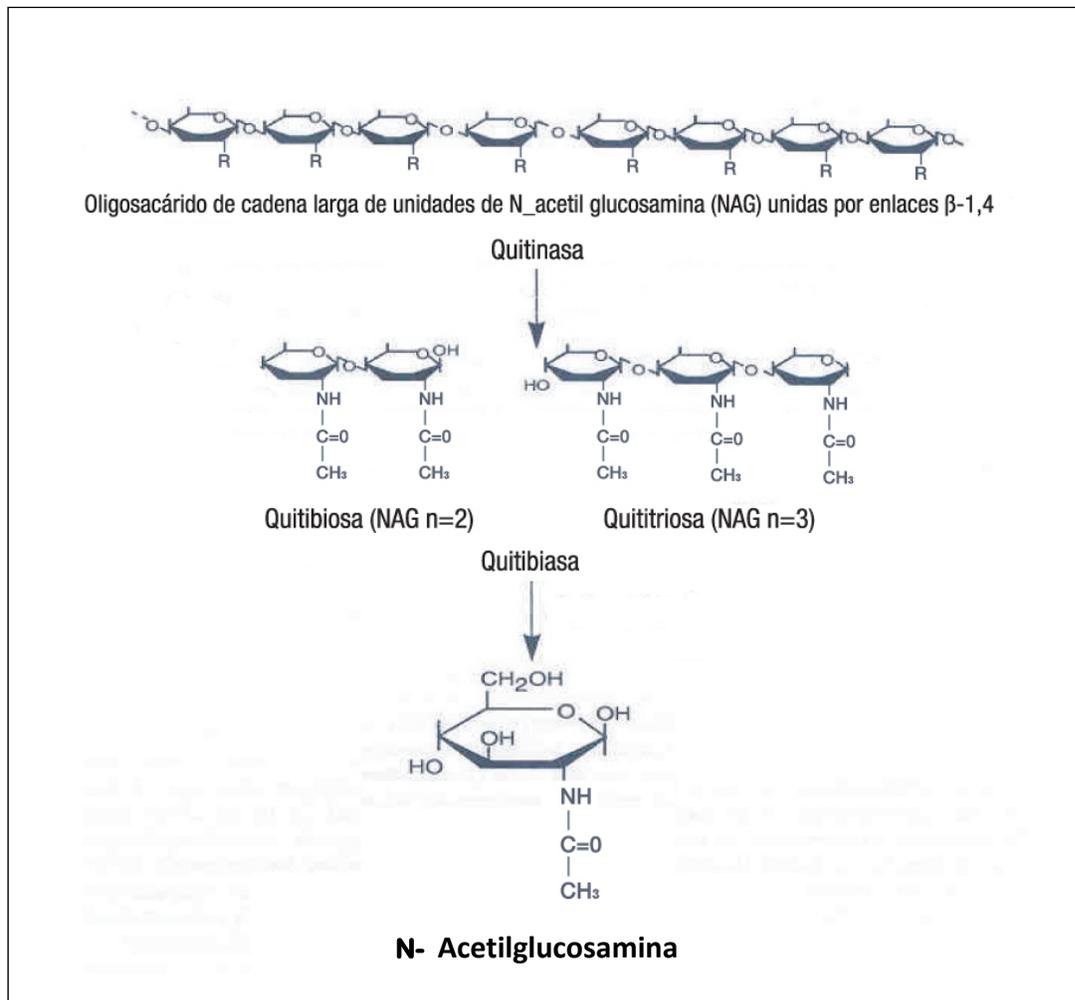


**Figura 3.** Estructura química de la quitina (polímero de *N*-acetil glucosamina [NAG]). Adaptado de Moat *et al.*, 2002.

### **Mecanismo de degradación de la quitina.**

Para que se lleve a cabo la degradación de la quitina se requiere la actividad de dos enzimas:

- a) La quitinasa separa la quitina en numerosos puntos, mayormente en el disacárido quitibiosa (NAG  $n=2$ ) y quititriosa (NAG  $n=3$ ).
- b) La quitibiasa hidroliza la quitibiosa y quititriosa a monómeros que son fácilmente biodegradables dentro de la célula siguiendo la remoción del lado de la cadena del *N*-acetilo (Figura 4).

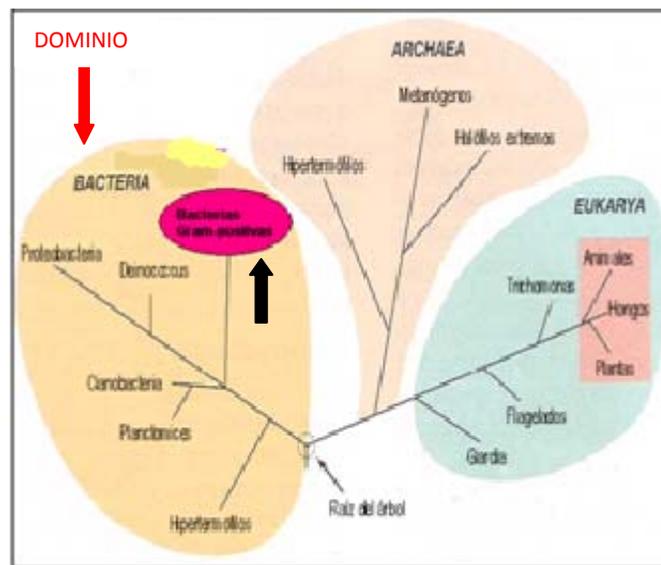


**Figura 4.** Esquema de degradación enzimática de la quitina.  
Adaptado de Moat *et al.*, 2002.

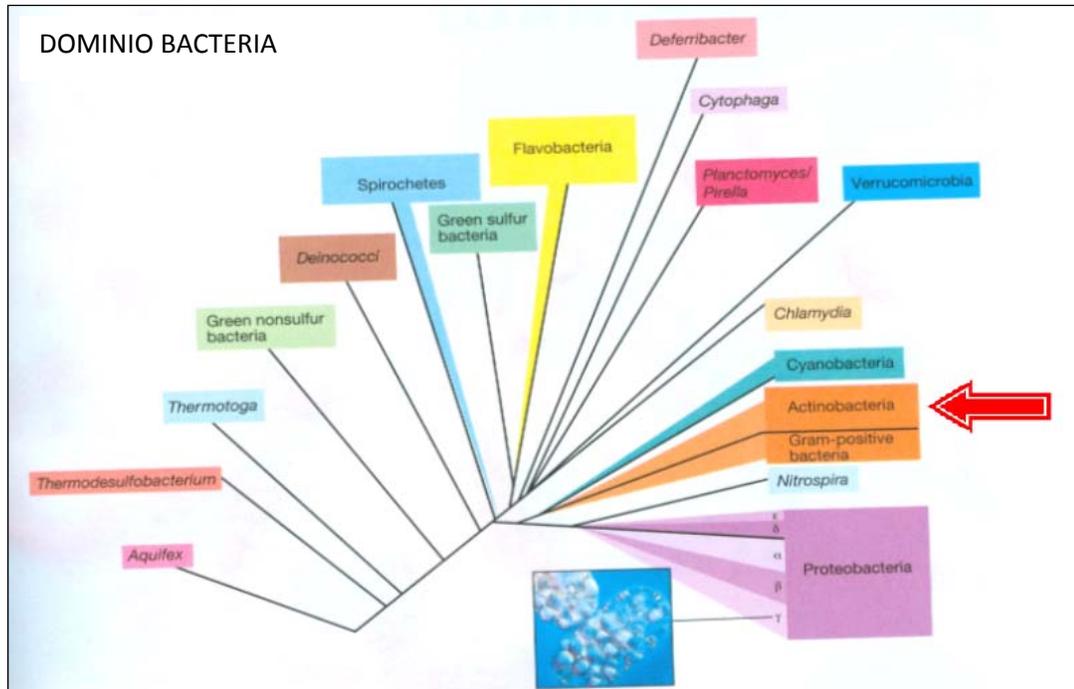
### **La clase *Actinobacteria*.**

El término “actinomiceto” tiene una larga y difícil historia. La primera descripción que se conoce de un “hongo radiado” (*actino* significa rayo y *miceto* hongo en latín) aparentemente proviene del investigador alemán Ferdinand Cohn en 1875. Con el paso de los años el término se fue acuñando para incluir diferentes agrupaciones de microorganismos hasta la primera clasificación “formal” que propusieron Waksman y Henrici en 1943 para estos microorganismos que inclusive se llegaron a considerar

como el “puente evolutivo” entre las bacterias y los hongos. En los 40’s a estos microorganismos se les consideraban como parte del Reino Fungi, sobre todo por sus características morfológicas macroscópicas y su desarrollo. No fue sino hasta después de numerosos estudios y en particular al comparar secuencias ribosomales del gen 16S rRNA que finalmente se estableció que los “hongos radiados” se encuentran relacionados filogenéticamente al dominio Bacteria (Figura 5), específicamente ocupando un lugar cercano con las bacterias Gram positivas (Figura 6).



**Figura 5.** Árbol de la vida construido a partir de secuencias del gen 16S rRNA. Sólo algunos grupos de cada dominio son mostrados. La flecha roja indica la posición de los actinomicetos en el Dominio Bacteria y la negra de las Grm positivas  
Ligeramente modificada de Madigan & Martinko, 2006.



**Figura 6.** Árbol filogenético con base en secuencias del gen del 16S ribosomal. La flecha roja indica la posición taxonómica de la clase *Actinobacteria* (Stackebrandt *et al.*, 1997) dentro de Dominio Bacteria. Ligeramente modificado de Madigan & Martinko, 2006.

Una vez establecida la posición evolutiva, el término -clase *Actinobacteria*- (Stackebrandt *et al.*, 1997) es el que actualmente debería de utilizarse para su denominación genérica, aunque en muchas ocasiones el término original (es decir actinomiceto) sigue siendo utilizado por diferentes grupos de investigación.

La clase *Actinobacteria* es un grupo extremadamente diverso que incluye diferentes familias, géneros y subórdenes. Por ejemplo, en agosto del año 2008, esta clase comprendía 51 familias y 253 géneros (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>). La gran mayoría de los

géneros que comprenden la clase han sido aislados de fuentes terrestres ya que se consideraba éste hábitat como su reservorio por excelencia.

La presencia de éstos en otros hábitats (por ejemplo el marino) se explicaba en términos de que las esporas de estos microorganismos eran acarreadas y depositadas en el mar. En la actualidad existe evidencia que indica que varias especies son autóctonas del ambiente marino, en particular aquellas pertenecientes al género *Salinispora* (Maldonado *et al.*, 2005a,b) y por lo tanto, presentan una serie de adaptaciones a éste ecosistema. Evidentemente el descubrimiento del género *Salinispora* ha contribuido a la apertura de una nueva era en el biodescubrimiento de microorganismos de la clase *Actinobacteria* en éste hábitat.

La clase *Actinobacteria* comprende al grupo de las bacterias Gram (+) caracterizadas por un alto contenido de Guanina y Citosina (Logan, 1994). La importancia en el estudio de estos está concentrada en dos géneros de impacto económico: *Mycobacterium*, agente causal de la tuberculosis, una de las enfermedades más antiguas en la historia de la humanidad y *Streptomyces*, los cuales son el modelo genético por excelencia en cuanto a la producción de la mayoría de los antibióticos empleados de manera comercial (Baltz, 2007; Maldonado, 2005 a, b).

Microorganismos pertenecientes a la familia *Micromonosporaceae* se han caracterizado por ser un grupo extremadamente complejo en cuanto a sus relaciones inter e intra específicas. Originalmente, se consideró que este grupo solo se encontraban en el suelo. Sin embargo, estudios recientes pusieron al descubierto la presencia de grupos específicos de actinomicetos (y relacionados a micromonospora) adaptados metabólicamente al ambiente marino (Maldonado *et al.*, 2005a, b). La importancia de estudiar *Micromonospora* y géneros relacionados radica en su habilidad

para adaptarse al agua por la producción de esporas hidrofílicas (De Menezes *et al.*, 2008) así como por el paradigma de establecer si estas pudieran provenir del ambiente acuático y/o terrestre (Maldonado *et al.*, 2009). La habilidad de degradar polisacáridos tan complejos como la celulosa y la quitina se ha considerado común entre diferentes miembros de este grupo de actinomicetos (De Menezes *et al.*, 2008).

Hay otros géneros de la clase *Actinobacteria* que también juegan un papel importante en los procesos de biodegradación y/o biorremediación (Logan 1994; Madigan & Martinko, 2006), pero en nuestro país este grupo bacteriano aún es poco estudiado. Sin embargo, a nivel mundial su elevado impacto económico es altamente reconocido (Baltz, 2007).

Es precisamente el interés desde este punto que la búsqueda de actinomicetos se ha reorientado hacia ambientes poco estudiados como sedimentos de ríos, lagos y océanos pues ofrecen la posibilidad de encontrar microorganismos nativos desconocidos que produzcan nuevos metabolitos farmacológicamente activos (Bull *et al.*, 2000, 2005; Baltz, 2000).

El interés por examinar la diversidad biológica de actinomicetos en el ambiente marino se origina décadas atrás sobre todo para la búsqueda y descubrimiento de productos activos de nueva composición química. Lo anterior se hizo evidente en 1984, con la descripción taxonómica del primer actinomiceto aislado de origen marino, *Rhodococcus marinonascens* aunque éste no muestra una dependencia por sales marinas para su crecimiento a diferencia del género *Salinospora*.

Mundialmente se reconocen tres géneros de la clase *Actinobacteria* como los predominantes en el ambiente marino, estos son: *Micromonospora*, *Rhodococcus* y *Streptomyces* (Goodfellow & Haynes, 1984). Sin embargo, el empleo de técnicas de

biología molecular para evaluar la diversidad microbiana a partir de la amplificación de regiones específicas han ido lentamente aclarando la biodiversidad actinobacteriana presente en sedimentos marinos (Stach *et al.*, 2003; Margavey *et al.*, 2004; Maldonado *et al.*, 2005 a, b).

El género *Streptomyces* es enorme, a este género pertenecen alrededor de 533 especies y 38 subespecies descritas de acuerdo con Euzéby (2010). Forman colonias discretas y liquenoides, algodonosas o grasosas inicialmente las colonias son relativamente suaves y crecen hacia adentro del medio de cultivo pero con el tiempo van desarrollando una hifa aérea que aumenta en tamaño hasta formar el micelo aéreo. La mayoría de las colonias se desarrollan a temperaturas entre los 25 y 35°C y crecen mejor entre valores de pH de 5.0 a 8.0 (Rodríguez, 2004).

El hábitat de la mayoría de los estreptomicetos es el suelo, donde constituyen del 1 al 20% de la población cultivable (Prescott *et al.*, 1999) siendo además los responsables del característico olor “tierra mojada”, por la síntesis de un compuesto aromático denominado “geosmina.” En general, se les considera como microorganismos de fácil crecimiento pues no requieren de vitaminas o factores específicos para su desarrollo. En el suelo donde logran encontrar una amplia superficie que permite el crecimiento del micelio con una subsecuente producción de esporas que asegura la supervivencia en períodos largos de sequía, heladas, presión hidrostática y condiciones anaeróbicas producidas por diferentes factores abióticos (Korn & Kutzener, 1992).

Se han aislado estreptomicetos de ambientes acuáticos, tanto del sedimento de la zona litoral como del mar profundo, desempeñando un papel importante en la mineralización. Estos pueden degradar sustancias resistentes como los son los

compuestos aromáticos, látex, lignina, pectina, queratina y quitina, lo que evidentemente tiene un impacto en el área de biotecnológica (Prescott *et al.*, 1999).

La mayoría de los estreptomicetos son saprófitos, sin embargo algunos se asocian a enfermedades de plantas y animales como es el caso de *Streptomyces scabies*, *S. caviscabies*, *S. acidicabies* y *S. turgidicabies* (Loria *et al.*, 2007) que causan la roña de de la papa. *Streptomyces somaliensis* (Skerman *et al.*, 1980) y *S. sudanesis* (Quintana *et al.*, 2007) son los únicos estreptomicetos reconocidos como patógenos para el ser humano. Se les asocia con el actinomicetoma, una infección en los tejidos subcutáneos que produce lesiones y conduce a abscesos, tumefacción e incluso destrucción ósea cuando no se trata (Prescott *et al.*, 1999). Existen pocos reportes de micetomas subcutáneos en felinos y delfines, en este caso producidos por algunas cepas de la especie *Streptomyces griseus* (Koneman *et al.*, 1999).

En el ciclo de vida de un estreptomiceto podemos observar la presencia de un micelio de sustrato (células que se desarrollan dentro y sobre la superficie del medio de cultivo) el cual no muestra una fragmentación característica. Por el contrario, la hifa aérea (células que crecen hacia arriba y afuera de la superficie del agar; Koneman *et al.*, 1999) se divide en un solo plano para formar cadenas que pueden ser de 3 a 50 conidiosporas inmóviles, con una textura superficial que oscila entre lisa, espinosa o verrugosa (Prescott *et al.*, 1999). Dicha formación de esporas puede, en algunos casos, semejar fragmentación dependiendo del grado de especialización de la hifa aérea.

Todos los *Streptomyces* poseen una pared celular Tipo I que está caracterizada por la presencia del ácido LL- diaminopimélico y glicina así como por la ausencia de azúcares característicos (Anderson & Wellington, 2001). Su contenido de guanina y

citosa (G+C) oscila entre 69 y 78%. Los estreptomicetos son los actinomicetos más estudiados, presentan una capacidad innata de sintetizar una extensa variedad de antibióticos entre los que se encuentran la anfotericina B, el cloranfenicol, la estreptomina, la neomicina, la nistatina y la tetraciclina. *Streptomyces coelicolor* es responsable de la producción de la mayoría de los antibióticos naturales usados actualmente en la medicina humana y veterinaria >65%; (Challis & Hopwood, 2003).

La producción de antibióticos en *Streptomyces* no es esencial para el crecimiento de las colonias de bacterias y se empiezan a producir cuando ha terminado la fase activa de crecimiento cuando el productor está entrando en una fase reproductiva o vegetativa (Prescott *et al.*, 1999). Su actividad biológica es amplia, incluyendo la inhibición y defensa con otros microorganismos, a través de efectos tóxicos hacia otros organismos multicelulares, plantas o animales (esto es coherente si entendemos que los estreptomicetos son bacterias no móviles; Challis & Hopwood, 2003).

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

Las especies del género *Streptomyces* se establecen a través de diferentes características morfológicas y fisiológicas como: a) el color de los micelios aéreos y de sustrato, b) la disposición de las esporas, c) las características superficiales de la espora, d) la utilización de carbohidratos, e) la producción de antibióticos, f) la síntesis

de mielina, g) la reducción de nitrato y h) la hidrólisis de la urea y ácido hipúrico (Prescott *et al.*, 1999).

Sin embargo, para prevenir la sobre-especiación, es necesario usar tanto métodos moleculares como quimiotaxonómicos. Los primeros incluyen la tipificación con fagos, hibridación DNA-DNA, comparación de los patrones de proteínas ribosomales, análisis de fragmentos de restricción de baja frecuencia (Anderson y Wellington, 2001), RFLP 16S-ITS fingerprinting (Lanoot *et al.*, 2005), electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de las proteínas celulares (Lanoot *et al.*, 2005), y la comparación de las secuencias de rRNA 16S y rRNA 23s (Anderson y Wellington, 2001) y los segundos incluyen únicamente estudios sobre la composición de la pared celular.

A diferencia del género *Streptomyces*, el género *Micromonospora* se caracteriza por la producción de una sola hifa de sustrato bien desarrollada y ramificada con un diámetro promedio de 0.5  $\mu\text{m}$ . En este caso, las esporas (no móviles nacen y crecen una a una a través de la hifa de sustrato, son cortas y en ocasiones en grupos aunque la mayoría de las veces de manera sencilla). No existe la formación de un micelio aéreo y las colonias son generalmente anaranjadas, que progresivamente pasan de marrones a negras, terminado con un aspecto mucoso de tonalidad oscura que es indicativo del proceso de esporulación.

Los miembros de este género también son grandes productores de compuestos antibacterianos como la gentamicina su mejor representante de importancia comercial. El género *Micromonospora* es : indiferenciable macro- morfológicamente hablando de los géneros *Salinispora* y *Verrucosipora* (que también pertenecen a la familia *Micromonosporaceae*, Rheims *et al.*, 1998) por lo que es necesario realizar el

secuenciamiento de genes conservados para poder establecer la posición taxonómica estricta de aislados que “aparentemente” son *Micromonospora* y así diferenciar a éstos tres géneros relacionados.

Estudios en *Micromonospora* son pobres a comparación de aquellos de *Streptomyces* por lo que un mejor entendimiento de la extensión de éste grupo microbiano puede llevar a mejores estudios respecto a su posible explotación.

## **OBJETIVO**

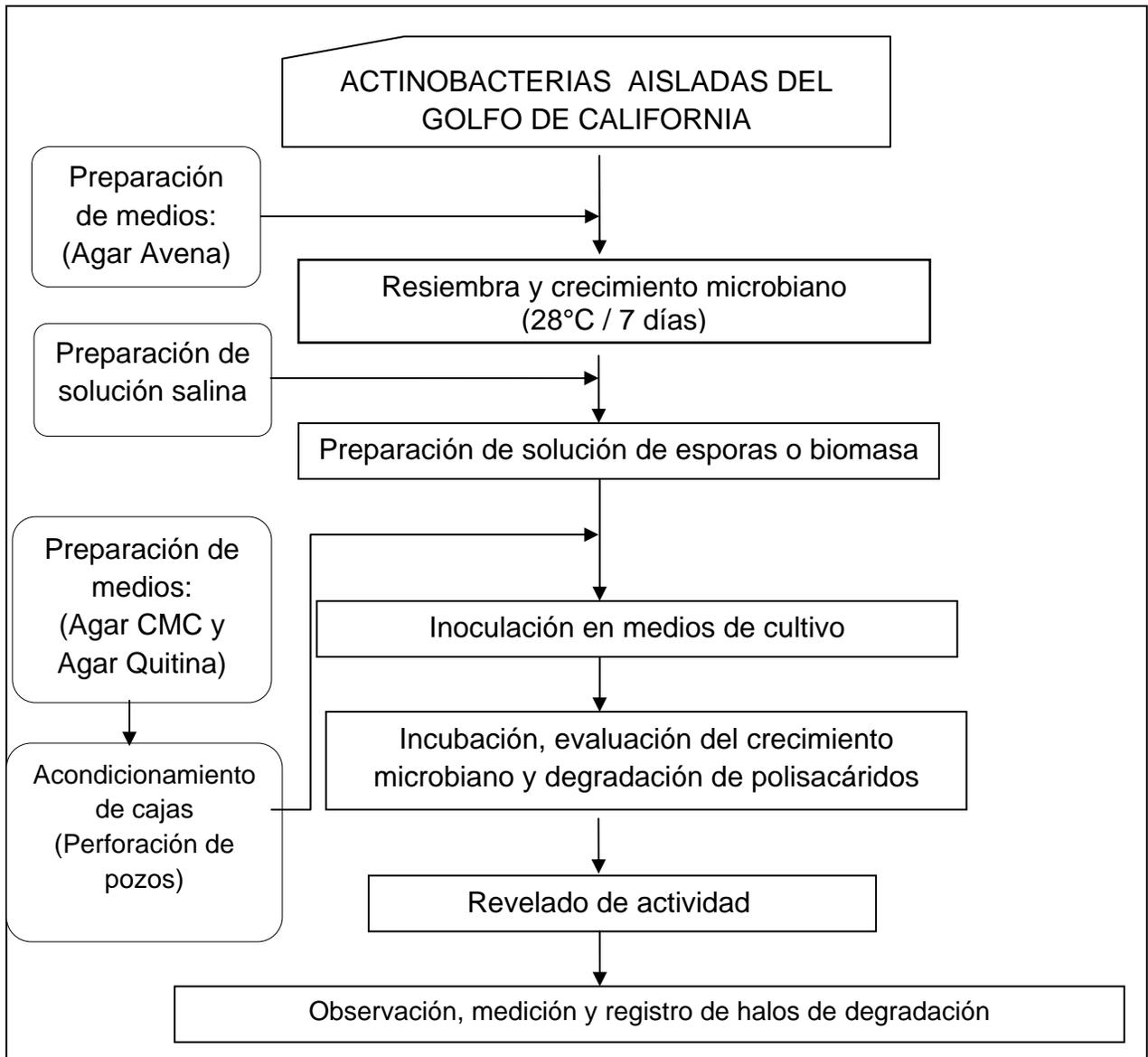
Evaluar la actividad celulolítica y quitinolítica de microorganismos de la clase *Actinobacteria* aislados de sedimentos marinos del Golfo de California.

## **HIPÓTESIS**

Aislados microbianos de la clase *Actinobacteria* recuperados del Golfo de California presentan actividad celulolítica y quitinolítica no dependiente de la concentración de agua marina adicionada al medio de cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La siguiente figura muestra el diagrama general de trabajo y éste se describe de manera detallada en la presente sección.



**Figura 7.** Diferentes pasos de la estrategia experimental para el presente proyecto.

## **Recursos microbianos.**

Los microorganismos estudiados en el presente trabajo se aislaron previamente del Golfo de California (Maldonado *et al.*, 2008). Se conservaron de acuerdo a lo reportado por estos mismos autores y los códigos utilizados no reportados en el artículo original son parte de la colección microbiana del Dr. Luis Ángel Maldonado, investigador del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM.

## **Preparación de medios.**

Durante la realización del presente proyecto se prepararon diferentes medios de cultivo con y sin sal marina. Los medios con agua marina se identificaron con un asterisco (\*). Por ejemplo, Carboximetilcelulosa preparado con agua bidestilada se identifico como – CMC- y este mismo medio pero preparado con agua marina se identificó como –CMC\*-. A continuación se indican los nombres de los medios, su identificación de cada uno, sus componentes, preparación y condiciones de esterilización.

### **Agua marina** (para 1000 mL)

35 g Sal marina (Instant Ocean, EUA)

1000 mL Agua bidestilada

### **Agar Avena -AA** (para 1000 mL)

20 g Avena (Gran vía, México)

1000 mL Agua marina (Instant Ocean, EUA)

12 g Agar bacteriológico (BD Bioxon, EUA)

## **Procedimiento**

1. En 1000ml de agua marina se coloca la avena.
2. Llevar a ebullición por 30 – 60 minutos.
3. Colar y macerar.
4. Ajustar el pH a 7.0 - 7.3.
5. Aforar el medio a 1000 mL, por la pérdida de volumen que pueda haber existido.
6. Agregar agar y repartir en botellas de 250 y/o 500 mL.
7. Esterilizar el medio en autoclave a 121°C por 15 minutos.
8. Vaciar en cajas Petri.
9. Dejar secar y solidificar.

## **Resiembra y crecimiento:**

1. Tomar una asada de los microorganismos.
2. Sembrar en cajas de medio Agar Avena por agotamiento.
3. Incubar a 28°C por 7 días.

## **Preparación de solución de esporas o biomasa:**

1. Colocar 1mL de solución salina (0.9%, w/v) en un tubo Eppendorf con la ayuda de micropipeta.
2. Tomar una asada de microorganismo y colocarla en el tubo Eppendorf.
3. Transferir la suspensión previamente inoculada con pipeta a un tubo de rosca y guardar en el refrigerador hasta su uso.

**Agar Carboximetilcelulosa-CMC** (para 100 mL de medio)

0.5 g carboximetilcelulosa (Sigma Aldrich)

0.1 g NaNO<sub>3</sub> (Sigma Aldrich)

0.1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Baker, EUA)

0.1 g KCl (Sigma Aldrich)

0.05 g MgSO<sub>4</sub> (Sigma Aldrich)

0.05 g Extracto de levadura (BD Bioxon, EUA)

0.1 g Glucosa (Difco, EUA)

1.2 g Agar bacteriológico (BD Bioxon, EUA)

**Procedimiento:**

1. Disolver todos los componentes en agua marina.
2. Ajustar el pH a 7.0-7.3.
3. Agregar agar.
4. Esterilizar el medio en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
5. Vaciar en cajas Petri.
6. Dejar secar y solidificar.

**Agar Quitina-AQ** (para 100 mL de medio)

40 mL quitina (para 400 mL de medio)

0.1 g NaNO<sub>3</sub> (Sigma Aldrich)

0.1 g  $K_2HPO_4$  (Sigma Aldrich)

0.1 g KCl (Sigma Aldrich)

0.05 g  $MgSO_4$  (Sigma Aldrich)

0.05 g Extracto de levadura (BD Bioxon, EUA)

0.1 g Glucosa (Difco)

1.2 g Agar bacteriológico (BD Bioxon, EUA)

### **Procedimiento:**

1. Disolver los componentes en agua marina.
2. Agregar quitina (Sigma Aldrich).
3. Ajustar el pH a 7.0 - 7.3.
4. Agregar agar.
5. Llevar al volumen correspondiente con agua marina.
6. Esterilizar el medio en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
7. Vaciar en cajas Petri.
8. Dejar secar y solidificar.

### **Acondicionamiento de cajas:**

1. Hacer pozo en los medios con un horador de metal del No. 3 al centro de la caja.

### **Inoculación de cajas:**

1. Inocular 30 $\mu$ L de la solución de esporas o biomasa dentro del pozo tanto del medio CMC y como en el de quitina.

### **Crecimiento y degradación de polisacáridos:**

1. Incubar las cajas a 37°C.
2. Revisar las cajas a los 7, 14 y 21 días.
3. Registrar los resultados

### **Preparación de rojo Congo:**

1. Preparar una solución acuosa de rojo Congo al 1% (Sigma Aldrich).

### **Revelado-Tinción de medio CMC:**

2. Agregar rojo Congo con la ayuda de una pipeta Pasteur sobre toda la superficie de la caja.
3. Dejar reposar durante 15 minutos.
4. Enjuagar con solución de NaCl [1M].
5. Repetir la tinción.
6. Dejar reposar nuevamente 15 minutos.
7. Enjuagar con solución NaCl [1M].

### **Medición de halos:**

1. Tomar fotografías, medir los halos con un Vernier y anotar los resultados del respectivo tipo de actividad.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se muestra la evaluación de la actividad celulolítica de cinco grupos bacterianos de la clase *Actinobacteria*, después de un tiempo de crecimiento de 14 días e incubación a 28°C en medios con o sin agua marina. Los medios se identificaron con sus siglas y aquellos preparados con agua marina además con un asterisco. En esta tabla se registró el revelado de halos de degradación después de la tinción con la solución acuosa con Rojo Congo. Para el género *Micromonospora* y sus cinco miembros (BA-12, BA-14, BD-4, BL-1 y DA-3) se observó actividad tanto en Carboximetilcelulosa preparado con agua destilada (CMC) como en Carboximetilcelulosa preparado con agua marina (CMC\*). En este grupo la mayor actividad se observó en Carboximetilcelulosa preparado con agua destilada (CMC). Respecto al miembro del género *Saccharomonospora* (AE-1) este presentó crecimiento en ambos medios pero solo presentó actividad celulolítica en aquel preparado con agua destilada (CMC). A diferencia del aislado AI-1 (del género *Saccharopolyspora*) el cual presentó crecimiento y actividad celulolítica en ambos medios (CMC y CMC\*), siendo una mayor actividad en aquel preparado con agua destilada (CMC).

En la tabla 1, también se puede observar que en CMC, el grupo del género *Salinispora* (10 microorganismos) no presentó crecimiento, y por consiguiente no se observaron halos de degradación ni uso de celulosa. Esto no quiere decir que este grupo microbiano no tiene actividad celulolítica, lo que sucede es que este grupo está adaptado al ambiente marino, son microorganismos dependientes de agua marina para su crecer. Entonces el hecho de que el medio tenga agua bidestilada y no agua marina no les permite crecer.

**Tabla 1.** Actividad celulolítica presente en los aislados, prueba por duplicado, registrada a los catorce días de crecimiento en medio carboximetilcelulosa preparado sin y con agua marina.

MICROORGANISMOS	AGUA BIDEUTILADA		AGUA MARINA	
	CRECIMIENTO	DEGRADACIÓN DE CELULOSA HALOS (mm)	CRECIMIENTO	DEGRADACIÓN DE CELULOSA HALOS (mm)
<b><i>Micromonospora sp.</i></b>				
BA-12	+++++	35 , 35	++++	18 , 18
Ba-18	+++	38 , 34	+++	22 , 20
BD-4	+++++	30 , 33	++++	13 , 13
BL-1	+++	31 , 30	++++	24 , 20
DA-3	++++	26 , 27	++++	18 , 20
<b><i>Saccharomonospora sp.</i></b>				
AE-1	+++	12 , 12	++	0 , 0
<b><i>Saccharopolyspora sp.</i></b>				
AI-1	+++++	33 , 33	+++++	23 , 22
<b><i>Salinispora sp.</i></b>				
AB-1	Sin crecimiento	0 , 0	+++	27 , 26
AN-1	Sin crecimiento	0 , 0	++++	16 , 16
AP-1	Sin crecimiento	0 , 0	+++++	0 , 0
AQ-1	Sin crecimiento	0 , 0	++	0 , 0
CNH-440	Sin crecimiento	0 , 0	++++	39 , 40
CNH-536	Sin crecimiento	0 , 0	+	0 , 0
CNH-643	Sin crecimiento	0 , 0	+++	18 , 19
CNH-646	Sin crecimiento	0 , 0	+++++	30 , 30
CNH-898	Sin crecimiento	0 , 0	+++	56 , 55
CNH-964	Sin crecimiento	0 , 0	++	14 , 14
<b><i>Streptomyces sp.</i></b>				
AK-1	+++++	33 , 31	+++++	21 , 21
AL-2	Sin crecimiento	0 , 0	+++	17 , 17
BX-2	+++++	25 , 25	+++	25 , 25
BX-3	+++	21 , 21	+++++	0 , 0

Los géneros de los aislados mostrados en la tabla fueron identificados previamente por métodos de caracterización molecular (Maldonado et al.,2008)

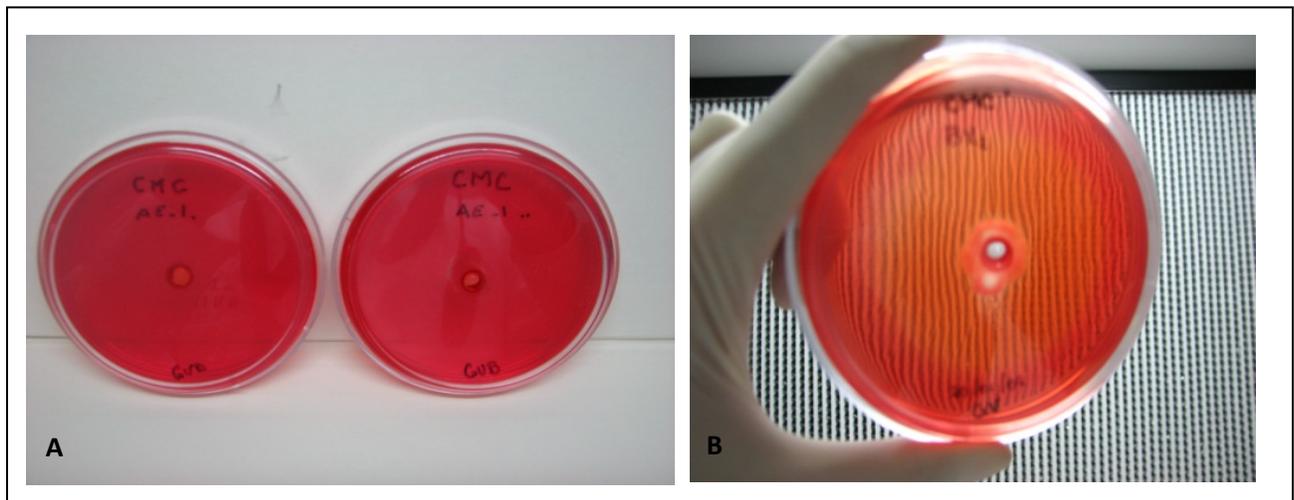
Es interesante mencionar que se observó una heterogeneidad respecto a la actividad celulolítica entre los miembros identificados como AB-1, AN-1, AP-1, AQ-1, CNH-440, CNH-536, CNH-646, CNH-898 y CNH-964.

Siete de ellos (AB-1, AN-1, AP-1, CNH-440, CNH-643, CNH-646 y CNH-898) presentaron actividad mientras que los restantes tres (AQ-1, CNH-536 y CNH-964) no presentaron. También se observó diferencia entre el crecimiento (biomasa) de éstos en el medio y su actividad celulolítica, mostrando incluso que algunos de menor crecimiento (escala de cruces) presentaron mayor actividad. Tal es el caso del aislado AB-1 y CNH-898.

Dentro del grupo del género *Streptomyces* (AK-1, AL-2, BX-2 y BX-3) el aislado AL-2 no presentó crecimiento en medio preparado con agua bidestilada. Pero a diferencia del género *Salinispora* hasta el momento no hay reportes que indiquen que algún estreptomiceto es dependiente del agua marina. En este punto podemos considerar que AL-2 podría ser tolerante moderado al agua marina y por eso no tuvo crecimiento en medio sin agua marina. Sin embargo, es interesante mencionar que AL-2 creció y presentó actividad celulolítica en medio CMC\*. Consideramos que AL-2 debe ser estudiado a mayor profundidad para establecer su intervalo de crecimiento y tolerancia en agua marina, porque lo que observamos en el presente estudio fue que requiere de un mayor tiempo de incubación para crecer en medio sin agua marina porque a estas condiciones si creció, pero su crecimiento siempre fue mejor cuando el medio se preparó con agua marina.

En específico para el presente proyecto AL-2, AK-1, BX-2 y BX-3 presentaron actividad celulolítica pero para AK-1, BX-2 y BX-3 tanto en medios con agua didestilada como con agua marina. Para AL-2 esta se observó hasta los 14 días de incubación y únicamente para medio preparado con agua marina. Para otros de los microorganismos evaluados se observó que particularmente en CMC\*, AE-1 (*Saccharopolyspora* sp.), AQ-1, CNH-536 (*Salinospora* sp.) y CNH-964 (*Salinospora* sp.) no presentaron actividad celulolítica. Para AE-1 y BX-3 se observó actividad en medio sin agua marina.

La mayoría de los microorganismos degradan celulosa en ambos medios, sin y con agua marina, con excepción del grupo *Salinospora* (por lo antes mencionado). En la siguiente figura se puede observar algunos de los microorganismos teñidos con Rojo Congo donde se evaluó la actividad celulolítica. En la Figura A microorganismos con actividad negativa y en B positiva.



**Figura 8.** Revelado de la actividad celulolítica (A, negativa y B, positiva) de microorganismos de la clase *Actinobacteria* aislados de Golfo de California. A, medio CMC inoculado con el aislado AE-1 (prueba por duplicado) y B, aislado BX-1 en CMC\*.

En general podemos observar que se forman tres grandes grupos por los halos registrados en medios de carboximetilcelulosa con agua bidestilada. El primer grupo (un aislados) con un intervalo de 1 a 12 (mm), el segundo (tres aislados) de 1 a 26 y el tercero (seis aislados) de 1 a 38, respectivamente. Consideramos que esto es interesante porque muestra la gran heterogeneidad de actividad celulolítica entre nuestros aislados. Esta información se puede utilizar para proponer aislados específicos para propósitos de bioprospección microbiana (enzimas celulolíticas) seleccionando primero a aquellos con una mayor actividad.

Para el caso de los medios de carboximetilcelulosa preparado con agua marina se puede observar que 15 microorganismos presentaron actividad celulolítica (un número ligeramente mayor que en medios con agua bidestilada ). En este caso CNH-898 presentó la mayor actividad con 56 mm y la menor la tuvo BD-4 con 13. A diferencia del medio con agua bidestilada aquí hubo cuatro grandes grupos. El primero fue el más numeroso (siete aislados) y presentó un intervalo de degradación de 1 a 18 mm. El segundo (seis aislados) presentó un intervalo de degradación de 1 a 25 mm. El tercero (dos aislados) presentó un intervalo de 1 a 39 y finalmente el cuarto grupo (un aislado) 56 mm. Es interesante mencionar que aunque la actividad de algunos aislados en general disminuyó cuando el medio contuvo agua marina es notable que continuara la actividad celulolítica.

Lo anterior porque en el mercado de enzimas microbianas (celulasas) es deseable que resistan por ejemplo altas temperaturas, diversos pH o diferentes concentraciones de Cloruro de sodio. Las enzimas presentes en nuestros aislados, en

particular las evaluadas con medio preparado con agua marina le proporcionan al microorganismo un cierto grado de stress y aún así presenta actividad celulolítica, lo que es sobresaliente.

En la Tabla 2 se muestra la evaluación de la degradación de quitina después de 14 días de crecimiento e incubación a 28°C. En esta se observa que en medio de quitina/agua bidestilada (Quitina), el grupo del género *Salinospora* no presentó actividad porque como ya se mencionó necesitan sal marina para crecer. En medio Quitina con agua marina (Quitina\*) algunos miembros de este grupo presentaron degradación. CNH-898 con la mayor actividad (23 mm) y AB-1 con la menor (9 mm). CNH-440, CNH-643 y CNH-646 mostraron el mismo valor de actividad (17 mm). Excepto CNH-536 que no presentó crecimiento en medio Quitina\*, el resto del grupo presentó crecimiento pero no actividad quitinolítica. Es interesante mencionar que únicamente un aislado presentó mayor actividad en medio Quitina\*. Este aislado fue el AL-2 y duplicó el halo de degradación en medio Quitina\* respecto a la registrada en Quitina.

Respecto a las micromonosporas, BA-12 y BA-18, BD-4 y BL-1 presentaron actividad quitinolítica en medio preparado con agua dibestilada, lo mismo que para AE-1 (*Saccharomonospora* sp.), AI-1 (*Saccharopolyspora* sp.) y AK-1, AI-2, BX-2 y BX-3 (*Streptomyces* sp.). Esto indica que solo un aislado (DA-3) no presentó actividad quitinolítica en medio quitina/agua bidestilada (Quitina).

**Tabla 2.** Actividad quitinolítica presente en los aislados, prueba por duplicado registrada a los catorce días de crecimiento en medio quitina preparado sin y con agua marina.

MICROORGANISMOS	AGUA BIDESTILADA		AGUA MARINA	
	CRECIMIENTO	DEGRADACIÓN DE QUITINA HALOS (mm)	CRECIMIENTO	DEGRADACIÓN DE QUITINA HALOS (mm)
<b><i>Micromonospora sp.</i></b>				
BA-12	+++	30 , 30	++++	11 , 11
Ba-18	++++	27 , 27	+++++	22 , 22
BD-4	++++	26 , 26	+++	13 , 13
BL-1	+++++	14 , 15	++++	0 , 0
DA-3	++++	0 , 0	++++	0 , 0
<b><i>Saccharomonospora sp.</i></b>				
AE-1	++	13 , 15	++	0 , 0
<b><i>Saccharopolyspora sp.</i></b>				
AI-1	+++	45 , 45	+++++	0 , 0
<b><i>Salinispora sp.</i></b>				
AB-1	Sin crecimiento	0 , 0	++++	9 , 9
AN-1	Sin crecimiento	0 , 0	++++	0 , 0
AP-1	Sin crecimiento	0 , 0	+++++	0 , 0
AQ-1	Sin crecimiento	0 , 0	+++++	0 , 0
CNH-440	Sin crecimiento	0 , 0	+++++	17 , 18
CNH-536	Sin crecimiento	0 , 0	Sin crecimiento	0 , 0
CNH-643	Sin crecimiento	0 , 0	+++++	17 , 15
CNH-646	Sin crecimiento	0 , 0	+++++	17 , 17
CNH-898	Sin crecimiento	0 , 0	+++++	23 , 23
CNH-964	Sin crecimiento	0 , 0	++++	0 , 0
<b><i>Streptomyces sp.</i></b>				
AK-1	+++++	25 , 26	++++	11 , 11
AL-2	+++	9 , 10	+++	18 , 20
BX-2	+++++	17 , 18	+++	9 , 9
BX-3	+++	13 , 10	+++++	0 , 0

Los géneros de los aislados mostrados en la tabla fueron identificados previamente por métodos de caracterización molecular (Maldonado et al.,2008)

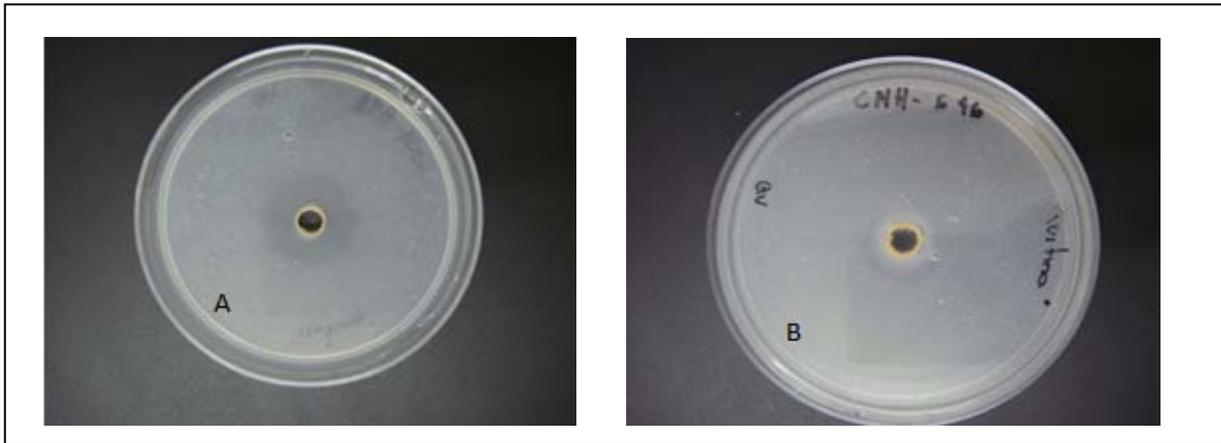
A diferencia del medio preparado con agua marina en donde se observó que solo BA-12 y BA-18 y BD-4 (micromonosporas), AB-1, CNH-440, CNH-643, CNH-646, CNH-898, CNH-964 (salinisporas) y AK-1, AI-2 y BX-2 (estreptomicetos) tienen actividad. En general, los microorganismos presentaron actividad quitinolítica homogénea en particular en medio preparado con agua marina.

Se observó que la mayoría de los microorganismos degradan quitina sin haber una preferencia clara por alguno de los medios evaluados. Los microorganismos BL-1, DA-3 (*Micromonospora* sp.), AE-1 (*Saccharomonosporas* sp), AI-1 (*Saccharopolyspora* s.p), AN-1, AP-1, AQ-1, CNH-536, CNH-964, BX-3, (*Salinispora* sp) no presentaron actividad quitinolítica.

Sin embargo, AI-1, BA-12, BA-18, BD-4, AK-1 también presentaron degradación de quitina. BX-3, AE-1 y AL-2 presentan la menor degradación de quitina, mientras que las cepas de grupo *Salinispora* no se desarrollan y por lo tanto no podemos evaluar su degradación de quitina comprobando que este grupo de microorganismos requieren de agua marina para su crecimiento (microorganismos propiamente marinos).

En general se observó que la mayoría de los microorganismos degradan quitina en medios con y sin agua marina, con excepción del grupo *Salinispora*.

En la Figura 10 se observa la actividad quitinolítica positiva de las cepas CNH-898 y CNH-646.



**Figura 10.** Actividad quitinolítica de algunos microorganismos del grupo *Salinispora*. A, CNH-898 y B, CNH-646.

10 microorganismos presentaron actividad quitinolítica en medio preparado con agua bidestilada (Quitina). Dos microorganismos de 1 a 9 mm de diámetro de degradación, siete de 1 a 18 mm y otros dos de 1 a 23 mm. Esto es interesante porque cuando se comparan esta actividad con la de CMC en general se puede decir que hay más actividad quitinolítica que celulolítica ya que los diámetros de degradación encontrados son mayores. Lo anterior tanto para medio sin agua marina como con ella.

Mientras que 11 microorganismos presentaron actividad quitinolítica en medios preparados con agua marina. Esto es interesante porque si se comparan los medios con agua con y sin agua marina podemos ver que hay microorganismos que solo presentaron actividad quitinolítica con medio con agua marina (aparte de las *Salinisporas*). Además que para el aislado AL-2 la actividad quitinolítica es del doble en medio con agua marina. La actividad de BA-12 se ve altamente afectada cuando el medio contiene agua marina.

## CONCLUSIONES

- Con la metodología empleada se determinó tanto la actividad celulolítica como quitinolítica de microorganismos aislados de sedimentos marinos del Golfo de California, en particular de los géneros *Micromonospora*, *Saccharamonospora*, *Saccharopolyspora*, *Salinispora* y *Streptomyces*.
- La actividad celulolítica y quitinolítica evaluada en los microorganismos fue heterogénea y está presente tanto en bacterias marinas estrictas como no marinas.
- Existen microorganismos cuya actividad celulo- o quitinolítica es mayor en medios preparados sin agua marina pero es interesante que en algunos casos aunque los microorganismos presentan una mayor actividad, tanto celulolítica como quitinolítica.
- Respecto a los microorganismos adaptados al ambiente marino se observó que también la actividad celulolítica y quitinolítica está distribuida heterogéneamente. Hubo aislados del género *Salinispora* que presentaron actividad tanto quitinolítica como celulolítica, pero hubo miembros que no las presentaron.
- El presente proyecto refuerza la importancia de estudiar el ambiente marino como una fuente importante de recursos microbianos y productores de enzimas importantes con futura aplicación en la industria, en particular la alimentaria, de detergentes o farmacéutica.

## RECOMENDACIONES

- Es necesario realizar experimentos para determinar el intervalo óptimo de tolerancia a NaCl o agua marina de algunos de los aislados.
- Sería interesante realizar otros experimentos para evaluar otras enzimas que podrían producir los aislados, por ejemplo lipasas y esterases.
- Sería interesante purificar las enzimas producidas por los microorganismos, estudiarlas y determinar su identidad química para elucidar si son enzimas nuevas o ya conocidas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Anderson A.S. & Wellington E.M.H. 2001. The taxonomy of streptomycetes and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**:797-814.
2. Badui D. S. 2006. Química de los alimentos. Pearson educación cuarta edición 78-79, 106, 324-330 pp.
3. Baltz R. 2007. Antimicrobials from actinomycetes: Back to the Future. *Microbe*. **2**:125-131.
4. Bull A., Stach J., Ward A. & Goodfellow M. 2005. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie van Leeuwenhoek*. **87**:65-79.
5. Bull A., Ward A. & Goodfellow M. 2000. Search and discovery for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **64**:573-606.
6. Challis L.G & Hopwood A.D. 2003 Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **100**:14555-14561.
7. De Menezes, Lockhart R., Cox M.J., Allison H.E. & McCarthy A. 2008. Cellulose degradation by Micromonosporas recovered from freshwater lakes of these actinomycetes by DNA Gyrase B Gene Sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*. **74**: 7080-7084.
8. Euzéby P. List of Prokariotic names with standing in nomenclature. Accessed June 2010. [http:// www.bacterio.cict.fr/](http://www.bacterio.cict.fr/)

9. Gonzalez-Franco A.C., Deobald L.A., Spivak A. & Crawford D.L. 2003. Actinobacterial chitinase-like enzymes: profiles of rhizosphere versus non rhizosphere isolates. *Canadian Journal of Microbiology*. **49**, 683-698.
10. Goodfellow M. & Haynes J.A. 1984. Actinomycetes in marine sediments. In: Ortiz-Ortiz L., Bojalil L.F. and Yakoleff V. (eds), Biological, biochemical and biomedical aspects of actinomycetes . Academic Press, Orlando, 453-472 pp.
11. Hoffman L., D'Argenio D., Bader M. & Miller S. 2007. Microbial recognition of antibiotics: ecological, physiological and therapeutic implications. *Microbe*. **2**:175-181.
12. Koneman E. W., Allen S.D. Janda W.M., Schreckenberger P.C & Winn W.C 1999. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas color. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. 1432 pp.
13. Korn W.F. & Kutzner H. J 1992. The family *Streptomycetaceae*. En Balows A., Trüper H. G, Dworkin M., Harder W. & Schleifer K. H. (eds). *The Prokariotes*. Springer Verlag. Vol 1. 921-995 pp.
14. Lanoot B. 2005. Improved taxonomy of the genus *Streptomyces*. Tesis doctoral. Universiteit Gent. Faculteit Wetenschappen, Laboratorium voor Microbiologie.
15. Logan N. 1994. Bacterial systematics. Blackwell Scientific Publications Oxford. 217 pp.
16. Loria R., Joshi M. & Moll S. 2007. *Streptomyces*: not just antibiotics. *Microbiology today*. **2**:64-67.

17. Madigan M.T & Martinko J.M. 2006 Brock Biology of microorganisms. 11<sup>th</sup> Ed. Pearson Prentice Hall, USA. 991 pp.
18. 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. *Applied and Environmental Microbiology*. **70**:7520-7529.
19. 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*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **55**:1759-1766.
20. 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.
21. Maldonado L.A., Fragoso-Yañez D., Pérez-García A., Rosellón-Druker J. & Quintana E.T. 2009. Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek*. **95**:111-120.
22. Moat A.G., Foster J., Spector, M. (Eds). 2002. Microbial Physiology. Editorial Wiley-Liss. 403-406 pp.
23. Prescott M.L., Harley P.J. & Klein A.D. 1999 Microbiology. Mc. Graw Hill interamericana, Madrid, España. 525-537 pp.

24. Quintana E.T., Wierzbicka K., Mackiewicz P., Osman A., Fahal A.H., Hamid M.E., Zakrzewska-czerwinska J., Maldonado L.A. & Goodfellow M. 2007. *Streptomyces sudanesis* sp. nov., a new pathogen isolated from patients with actinomycetoma. *Antonie van Leeuwenhoek*. **93**:305-313.
25. Rheims H., Shumann P., Rhode M. & Stackerbrandt E. 1998. *Verrucosispora gifhornesis* gen. nov., sp. nov., a new member of the actinobacterial family *Micromonosporaceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **16**: 313-340.
24. Rodriguez C. 2004. Selective isolation and characterization of novel members of the family *Streptomycetaceae*. Tesis doctoral. Universidad de Newcastle, Newcastle upon Tyne, Inglaterra Reino Unido. 53-61 pp.
26. Skerman V.B., Mc Gowan V. & Sneath P. H. 1980: Approved lists of bacterial names. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **30**:225-420.
27. Stach J.E.M. & Bull A.T. 2005. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. *Antonie van Leewenhoek*. **69**: 6189-6200.
28. Stackebrandt E., Rainey F.A., & Ward- Rainey N.L. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **47**:479-491.
- Waksman S.A. & Henrici A.T. 1943. The nomenclature and classification of the actinomycetes. *Journal of Bacteriology*. **46**: 337-341