



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA DE ACTINOBACTERIAS AISLADAS
A PARTIR DE ECOSISTEMAS NACIONALES**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

FILIO BRISEÑO LUIS ALEJANDRO



MÉXICO, D.F.

2012



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: LILIA MARIA ERNESTINA VIERNA GARCÍA

VOCAL: Profesor: RODOLFO PASTELIN PALACIOS

SECRETARIO: Profesor: LUIS ÁNGEL MALDONADO MANJARREZ

1er. SUPLENTE: Profesor: MARTHA GILES GÓMEZ

2° SUPLENTE: Profesor: GONZALO CASTILLO ROJAS

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA. LABORATORIOS DE RECURSOS MICROBIANOS Y DE ANÁLISIS QUÍMICOS, CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO, D.F.

ASESOR DEL TEMA: DR. LUIS ÁNGEL MALDONADO MANJARREZ

SUSTENTANTE: FILIO BRISEÑO LUIS ALEJANDRO

AGRADECIMIENTOS

Ante todo agradezco a la vida por la oportunidad de terminar este excelente ciclo, le agradezco a la UNAM y a la facultad de Química que me han dado una gran preparación profesional, también agradezco al ICMYL por abrirme sus puertas para realizar este proyecto. Es importante mencionar que parte del trabajo experimental de esta tesis fue financiado con recursos asignados al proyecto PAPIIT IN212011 (2011-2013) asignado al Dr. Luis A. Maldonado Manjarrez.

Agradezco a las personas que permitieron la realización de esta tesis; en especial al Dr. Luis Ángel Maldonado Manjarrez, por su guía y ayuda como el principal asesor del mismo, a la Dra. Erika Quintana por sus valiosas aportaciones y apoyo en el contenido del trabajo. También agradezco a los profesores Lilia Vierna y Rodolfo Pastelin por su participación en la mejora del trabajo.

Agradezco a mis compañeras de laboratorio que contribuyeron directamente en la realización de los experimentos. Gracias QFB Mariela Segura enseñarme tantas cosas y por prestarme tus medios de cultivo, Gracias QFB Isabel Vargas por ayudarme con las técnicas PCR, gracias QA Karla Erazo por enseñarme a preparar OA,

Además le tengo un agradecimiento muy especial a la Química española Amparo, la QFB Daniela López y a la química honoraria Karina Suarez, que realizaron mis experimentos bajo mi supervisión cuando la férula en mi brazo me impidió trabajar.

También gracias a ti, mamá que eres esa gran mujer que está detrás de todos mis logros, específicamente en este caso de los académicos.

Finalmente le doy las gracias a Dios, que está en todo lo que logramos y se manifiesta en todas las personas que he mencionado hasta ahora.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo en especial a mi familia que me ha apoyado tanto en todos estos años de estudio. A mi mamá Ale que me ha dado la dicha de la vida y me ha permitido llegar a ser el hombre que soy hasta ahora, a mi mamá Tita que con su cariño y paciencia me ha dado el carácter y la voluntad para encarar a la vida, a mi hermano Charly cuya compañía a diario me hizo ver el camino profesional mucho más sencillo de lo que realmente es (sé que pronto también me invitaras a tu examen profesional), y también a mi papá Toño por su compañía y exigencia, espero pueda hacerte sentir muy orgulloso.

Le dedico este trabajo también a Karina Suarez, “Payita”, que durante toda mi carrera me acompañó, lo que me permitió encontrar el equilibrio y disfrutar de esta época universitaria al máximo, nunca terminaré de agradecerte estos maravillosos años y todo el amor que seguimos disfrutando mi vida.

Una dedicatoria a la gente del laboratorio con las que conviví en gran parte del trabajo experimental de la tesis: Marielis, Isamonospora, Faby Patiño, Karla y el Dr. Estuardo.

Una dedicatoria a todos mis amigos de la Fac, es muy difícil que los pueda mencionar a todos, que son gente muy valiosa y de diferentes carreras y generaciones con las que disfrute de clases, exámenes, tareas, fiestas, futbol y demás convivencias y aprendizajes. Por mencionar algunos, están amigos como *Vanessa Cuchu*, mi carnal Rubén, Vic Ángulo, toda “La bandota”, *Erick Gucho*, *Karenina*, “amigos de la jardinera de 1er. Semestre”, Evelina, Alita, mi *hermano el Mamer*, Ely Karen, Marianita, Robert, Isma, Gisela, Jaz, Karina Sandoval, Rossy, Titina, Kuky, Dani, Bere, Pancho, Atzin, Arturo *le champiñon*, Ivonne, Chucho fragoso, el Sr. Jairo, Jean Carlo, Butty, Beto de la rosa, Rodrigo y un gran Etc.

Y también le dedico este logro a mis mejores amigos, los 36’s, con los que a pesar de los años y las ocupaciones se que siempre cuento. Maza, Borre, Eder, Daniel, Rafa, Alexis y Cajuela. ¡Venga Tyrtis!

ÍNDICE

Datos del jurado	i
Agradecimientos	ii
Dedicatorias	iii
Resumen	1
1. Marco teórico e Introducción	
1.1 México y su biodiversidad	2
1.2 Aislamiento y caracterización de microorganismos	5
1.2.1 <i>La clase Actinobacteria</i>	6
1.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa	11
1.2.3 Pared celular y Ácido Diaminopimérico	13
1.2.4 El género <i>Streptomyces</i>	16
1.2.5 Actinomicetos raros	19
1.3 Compuestos bioactivos de origen microbiano	21
1.4 Aislamiento de actinomicetos a partir de sedimentos marinos y su caracterización	25
2. Planteamiento del problema	28
2.1 Objetivos	29
2.2 Hipótesis de trabajo	29
3. Diseño experimental (materiales y métodos)	
3.1 Crecimiento y conservación de recursos microbianos	30
3.2 Caracterización de las cepas aisladas	32
3.3 Evaluación de la actividad antibacteriana de las cepas aisladas	36
4. Resultados y discusión	
4.1 Caracterización de los aislados	38
4.2 Determinación de la actividad antibacteriana	41
4.2.1 Evaluación de diferentes temperaturas para el crecimiento de cepas de <i>S. epidermidis</i>	42
4.2.2 Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antibacteriana	43
5. Conclusiones	57
6. Perspectivas	58
7. Bibliografía	59
8. Apéndice	65

RESUMEN

Estudios recientes en el área de la biología molecular basados en el gen 16S ribosomal sugieren que únicamente alrededor del 1% de la diversidad microbiana mundial se ha logrado cultivar en el laboratorio, por lo que en países megadiversos como el nuestro esto debería ser considerado como un área fértil de descubrimiento. En este sentido, para el aislamiento de microorganismos, la lógica indica que bastaría con buscar en cualquier ambiente o ecosistema que se nos ocurriese, pero sin duda recuperar microorganismos a partir de lugares poco accesibles o inusuales podría favorecer el descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas a partir de dichos recursos microbianos.

La búsqueda de nuevos productos con actividad antimicrobiana es un área que debería de satisfacer la creciente demanda en el área de salud pública, ante la presencia alarmante no solo de cepas multiresistentes, sino también de enfermedades infecciosas nuevas y/o re-emergentes.

La clase Actinobacteria, comprende un grupo de bacterias gram positivas con un alto porcentaje de guanina y citosina que son considerados por excelencia como productores de metabolitos secundarios, entre los que destacan los antibióticos puesto que alrededor de dos terceras partes de todos los antibióticos conocidos actualmente provienen de bacterias pertenecientes a esta clase.

En el presente trabajo, distintas cepas de la clase Actinobacteria aisladas de muestras biológicas nacionales, se caracterizaron y se evaluó su actividad antibacteriana ante un diverso rango de cepas bacterianas de referencia.

La caracterización nos permite confirmar que estos aislados microbianos efectivamente corresponden a la clase Actinobacteria. Por otro lado la actividad antibacteriana de los aislados frente a cepas de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* permite proponer que se requieren estudios a profundidad que permitan aprovechar de una mejor manera los recursos microbianos nacionales.

1) MARCO TEÓRICO E INTRODUCCIÓN

1.1 MÉXICO Y SU BIODIVERSIDAD

La biodiversidad a nivel mundial es sumamente extensa, de alrededor de 1.75 millones de especies que han sido descritas y nombradas formalmente, solo aproximadamente 5,000 corresponden a microorganismos procariotas, como es el caso de las bacterias, seres cuya diversidad evolutiva y genética definitivamente es mucho mayor [Wheelis, 2008]. Aunque estos datos varían mucho en la literatura para la totalidad de seres vivos (se calculan entre 5 y 50 millones de especies desconocidas), resulta un hecho que existen buenas razones para considerar que aún quedan un gran número de especies por descubrir y estudiar. Una estimación adecuada ronda los 14 millones de especies inéditas, es decir entre un 85 a 90% de la biodiversidad global, de acuerdo a datos del Convenio sobre la Diversidad Biológica. Sin embargo, la distribución de las especies en la Tierra no es uniforme y el patrón más evidente muestra que, en general, la riqueza de especies tiende a aumentar hacia el ecuador, ya que se reúnen las condiciones geológicas, hidrológicas, climatológicas y bióticas para el desarrollo de los llamados “*ecosistemas mayores*”, es decir, las áreas marinas y costeras, las aguas intercontinentales, los bosques, las tierras secas y las poco húmedas [Global Biodiversity Outlook, 2010].

En este sentido, México es un país megadiverso ya que cuenta con grandes zonas en su territorio donde las condiciones permiten el desarrollo de estos ecosistemas. De hecho, el número total de especies conocidas en México es de 65 mil aproximadamente, lo que lo coloca con al menos 10% de la diversidad terrestre total del planeta, y aunado a esta riqueza el país cuenta con gran cantidad de especies distribuidas exclusivamente dentro de sus límites geopolíticos, es decir, especies endémicas. En el caso de la biodiversidad marina el país también cuenta con condiciones de megadiversidad, la cual debe ser igual o mayor que la terrestre, lo cual tiene sentido si tomamos en cuenta las siguientes

cuestiones y que nos permiten pensar que la mayor cantidad y distribución de especies en los distintos ecosistemas se encuentre en el agua y no en la tierra:

1.- En primer lugar está el hecho de que la vida surgió por primera vez en los ambientes marinos hace aproximadamente 3,900 millones de años mientras que en la Tierra lleva tan solo unos 500 millones de años, de acuerdo con las teorías evolutivas más aceptadas. En otras palabras se puede decir que las especies de microorganismos oceánicos han tenido mucho tiempo para evolucionar y diferenciarse en comparación con las especies continentales.

2.- El planeta está cubierto en un 75% de su superficie por agua, lo que quiere decir que los mares conforman a los “*ecosistemas mayores*” con la mayor extensión, situación que en México también sucede. Si revisamos los ya mencionados límites geopolíticos del país lo anterior se puede constatar, pues el territorio nacional tiene una extensión 1.4 veces mayor de aguas que de superficie terrestre. Aproximadamente 2.7 millones de Km² son mar, incluyendo el Mar Territorial (12 millas náuticas a partir de la línea costera) y el mar patrimonial ó también llamado Zona Económica Exclusiva (200 millas náuticas desde el litoral) por tan solo 1,964,375 Km² de suelos (continental e insular) [Cifuentes *et al.*, 1991; Figura 1].



Figura 1. Mar patrimonial de México.

(Fuente: <http://mexico.pordescubrir.com/hay-cuatro-tipo-de-playas-en-mexico.html> -Marzo 2011-).

Dentro de los límites del mar patrimonial el país tiene, entre otros derechos, la capacidad de aprovechar y explotar los recursos naturales. En este sentido debemos recalcar que los genes, las especies y los ecosistemas que conforman la diversidad biológica proporcionan recursos y servicios esenciales para la humanidad ya sea mediante la explotación directa o por el impacto indirecto en otras actividades [Global Biodiversity Outlook, 2010]. Por todas estas razones la búsqueda de nuevas especies en los mares mexicanos es de especial interés no solo biológico, sino también económico-social, lo que tiene especial relevancia en el caso de los microorganismos debido a que por varias de sus características son aprovechados en diversas industrias, desde la alimentaria hasta la farmacéutica.

Las condiciones marítimas son muchas veces variadas, diversas y únicas en comparación con las que se presentan en tierra como son: rangos de presión entre una y 1000 atmósferas en la superficie y en las aguas abisales respectivamente, temperaturas debajo de los -10°C a más de 400°C (geiseres), presencia o ausencia de O_2 u otros gases, presencia o ausencia de luz, concentraciones salinas entre 25 y 40 g/L, rangos de pH tanto ácidos como alcalinos muy elevados (de 1 a 11), y escasos nutrientes que además pueden ser difíciles de degradar (azúcares, grasas, celulosa, alginatos, quitina, hidrocarburos, fenoles) [Rheinheimer, 1987]. Todo esto brinda la posibilidad de encontrar no solo nuevas sino además singulares especies de microorganismos, en especial en el caso de las bacterias, debido a la gran capacidad de adaptación de estos organismos a varias de estas condiciones extremas [Lam, 2006].

1.2 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS

Desde los inicios de la microbiología, el aislamiento y cultivo de microorganismos, a partir de sus hábitats saprofíticos o parasitarios, ha representado uno de los principales obstáculos para su estudio, por ejemplo, para su explotación o para combatirlos cuando son el agente causal de alguna patología. La dificultad radica en la imposibilidad de cultivar a un microorganismo *in vitro* e inclusive *in vivo* porque en el laboratorio muchas veces no es posible reproducir los requerimientos que tienen para lograr su adecuado desarrollo, como pueden ser nutricionales (fuentes de C, N, S, P u otros sustratos), de temperatura, de pH, de luz, de O₂ ó CO₂, de sales, entre otros. Estudios recientes basados en biología molecular sugieren que únicamente alrededor del 1% de la diversidad microbiana mundial se ha logrado cultivar en el laboratorio [Sogin *et al.*, 2006].

El gen 16S rRNA (del inglés *ribosomal RNA*) comprende una macromolécula de ácidos nucleicos (o proteínas al ser traducido) que presenta cambios en su secuencia a medida que pasa el tiempo de manera lineal por mutaciones neutrales, lo que permite evaluar las distancias evolutivas entre especies, incluso entre aquellas muy relacionadas, y por ello es la molécula o cronómetro molecular más ampliamente empleado para la realización de mapas filogenéticos entre los organismos procariotas [Rodicio y Mendoza, 2004]. Esta molécula se encuentra sumamente conservada entre especies, es muy antigua, todas las bacterias presentes la tienen, y solo se ve involucrada en la transferencia horizontal de genes, lo que indica que los cambios en su secuencia se deben únicamente a las mutaciones que se presentan en la reproducción asexual [Boucher *et al.*, 2003; Madigan *et al.*, 2004].

El descubrimiento y aislamiento de nuevos microorganismos depende del hallazgo de nuevas fuentes de materiales biológicos, así como de la creatividad y capacidad de los investigadores para descubrir, evaluar y desarrollar dichas fuentes. Para encontrar microorganismos bastaría con estudiar cualquier

ecosistema que se ocurriera, pero sin duda recuperar microorganismos a partir de lugares poco accesibles o inusuales favorecería el descubrimiento de nuevas especies. La búsqueda de microorganismos en los ambientes marinos, cuenta con la dificultad inherente de estudiar las profundidades de los mares (costos, metodologías) por lo que es un área fértil de descubrimiento.

1.2.1 LA CLASE *ACTINOBACTERIA*

La clase *Actinobacteria* se distingue por ser un extenso grupo de bacterias conocido genéricamente con el término “actinomicetos” y que tiene relación en aspectos morfológicos, fisiológicos e inclusive ecológicos. Son bacterias complejas consideradas como Gram positivas, de crecimiento lento, con un contenido elevado de Guanina + Citocina (C+G > 50%, en promedio entre 54 a 75%) y que en algunos casos presentan ramificaciones parecidas a hifas fúngicas [Logan, 1994; Staley *et al.*, 2007].

Los actinomicetos como la mayoría de las células procariotas presentan un cromosoma único y haploide, que resulta tener una de las mayores longitudes de entre todas las bacterias, por ejemplo el cromosoma de *E. coli* tiene 4640 kpb siendo un tamaño promedio, en cambio *Streptomyces coelicolor* tiene 7825 kpb lo cual también es un indicativo de su complejidad [Brooks *et al.*, 2008].

➤ Metabolismo y hábitat de la clase *Actinobacteria*

La capacidad de producir metabolitos secundarios bioactivos por procesos antagónicos, es sin duda la característica más importante que distingue a esta clase bacteriana. Muchos de estos compuestos actúan como agentes quimioterapéuticos naturales, de hecho en la actualidad casi el 70% de los antibióticos y el 40% de otros metabolitos bioactivos de consumo humano aislados de microorganismos provienen de diferentes especies de actinomicetos.

Mediante procesos biotecnológicos, diversas especies de actinobacteria son utilizadas en gran variedad de industrias como fuente de metabolitos de interés. Por ejemplo, la especie *Corynebacterium glutamicum* sigue siendo la fuente inagotable de ácido glutámico que se emplea en la industria alimentaria. En parte, la razón de esta gran utilidad se debe a que los actinomicetos son bacterias quimioheterótrofas con una gran capacidad de degradación de sustratos, para usarlos como fuentes de nitrógeno y carbono, ya sea sencillos (etano, propano) o complejos (almidón, celulosa), ya que cuentan con una enorme cantidad de enzimas (amilasas, celulasas, hemicelulasas, peptinasas, isomerasas) que incluso pueden actuar a altas temperaturas [Fogarty & Kelly, 1990]. Esta capacidad proteolítica y termoestable para degradar materia orgánica es la que además seguramente les permite desarrollarse y adaptarse a una gran cantidad de climas inusuales.

En su mayoría las especies de esta clase son saprófitas y aerobias (metabolismo oxidativo), por lo que comúnmente se encuentran y aíslan de la suelo, de hecho, de este modo es como se han aislado la mayor cantidad de especies conocidas. Sin embargo, no solo se restringen a este tipo de hábitat sino que algunos de ellos se encuentran viviendo en otros ambientes. Lo anterior, está relacionado a las características únicas que distinguen a cada especie. Por ejemplo existen muchas especies que se encuentran viviendo en hojas, detritus y muchos otros materiales por medio de la formación de biopelículas (*Streptomyces*), como simbioses de plantas (*Frankia* con algunas especies de angiospermas como *Leifsonia*), animales, y en el caso de ambientes marinos, algas, esponjas y corales [Prudhomme *et al.*, 2008; Izumi *et al.*, 2010].

En el área clínica sin embargo, también existen algunas especies patógenas para hombres y animales, más que nada como seres oportunistas, excluyendo a *Mycobacterium tuberculosis*, el agente infeccioso bacteriano con mayor número de muertes en la historia de la humanidad [Cole *et al.*, 2004].

También existe una buena variedad de especies que se encuentran en ambientes tan diversos como son la cavidad oral humana (un ambiente anaerobio) con metabolismo fermentativo como en el caso de *Actinomyces naeslundii* y *A. odontolyticus* o en las profundidades del mar en los sedimentos. Con respecto a esto último hay que mencionar que se da el caso de especies autóctonas y obligadas, como es el caso del género *Salinispora* [Maldonado *et al.*, 2005a, Gontag *et al.*, 2010].

Para los ecosistemas marinos se sabe que algunos de los géneros facultativos de las aguas continentales son *Nocardia*, *Micromonospora*, *Streptomyces* y *Actinoplanes* cuyas especies puede que procedan de otros biotipos o sean endémicas [Wheelis, 2008; Maldonado *et al.*, 2009; Maldonado *et al.*, 2005b]. Con respecto a los actinomicetos marinos hay que comentar algunas de las características que les permiten desarrollarse ahí como son la movilidad (pocos géneros), su crecimiento lento o atípico, su capacidad de utilizar concentraciones muy bajas de nutrientes, su pleomorfismo, su capacidad proteolítica y su capacidad de esporular [Marín, 2003].

➤ Ciclo de vida de la clase *Actinobacteria*

Los actinomicetos se distinguen por presentar un ciclo de vida bien definido. Sin embargo, el ciclo de vida de *Streptomyces* es el ejemplo más estudiado ya que la mayoría de los actinomicetos desarrollan de este modo, por medio de células filamentosas ramificadas, flexuosas y en ocasiones tabicadas que se fragmentan perpendicularmente con ramificaciones dicotómicas, que se conocen como pseudo-hifas y que presentan una fragmentación por fisión binaria en elementos cocoides o bacilares [Murray *et al.*, 2007; Arenas, 2008; Figura 2].

En su conjunto las pseudo-hifas forman un micelio microsinfonado, es decir, menor a 1 μm de diámetro (a diferencia de los hongos) y que puede ser de dos tipos. El primer tipo de micelio es el vegetativo o sustrato, que se encuentra “al ras de suelo” y que le permite tomar los nutrientes del medio. El segundo tipo de

micelio es el aéreo, que dependiendo del género se presenta en gran cantidad o prácticamente no lo hace, siendo el responsable de la fisión binaria, y por lo tanto, de la formación de esporas (aisladas o en cadenas) como forma de resistencia o de reproducción asexual a corto plazo (debido a que es poco latente y viable en comparación con esporas de otras bacterias). El micelio aéreo contribuye además en la formación de metabolitos secundarios en la *idiofase* (llamados así para diferenciarlos de los metabolitos primarios o producidos en la etapa primaria de crecimiento, la *trofofase*) [Soriano & Soriano, 2010; Contreras, 2011].

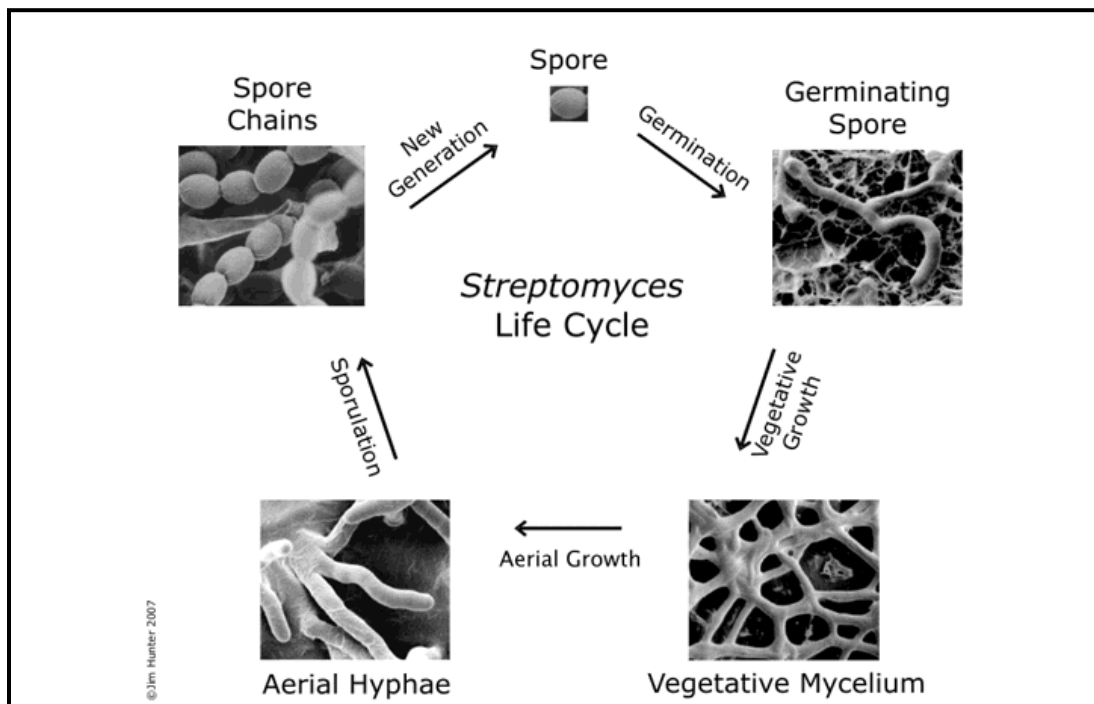


Figura 2. Ciclo de vida de *Streptomyces*.

(Fuente: [http://openwetware.org/images/e/ef/Streptomyces_Life_Cycle_\(small\).gif](http://openwetware.org/images/e/ef/Streptomyces_Life_Cycle_(small).gif) –marzo 2011-)

➤ Taxonomía y filogenia de la clase *Actinobacteria*

Pese a que la clase *Actinobacteria* tiene en común las características previamente mencionadas, evidentemente existen diferencias particulares para cada uno de los géneros. La incorporación de estudios basados en moléculas de DNA, contribuyó enormemente y ha facilitado un mejor entendimiento de las relaciones entre los distintos géneros que actualmente conforman a esta clase de microorganismos. Las características quimi taxonómicas (composición de la pared celular), fenotípicas y genotípicas han dado como resultado un marco adecuado

que favorezca la correcta identificación y asignación de grupos particulares de actinobacterias [Stackebrandt *et al.*, 1997; Zhi *et al.*, 2009].

La revolución taxonómico-biológica con base en el uso de marcadores moleculares propuesta por el microbiólogo Carl Woese basándose en el uso del gen 16S rRNA [Woese *et al.*, 1990] Dividió filogenéticamente a los seres vivos en tres dominios como se muestra en la Figura 3.

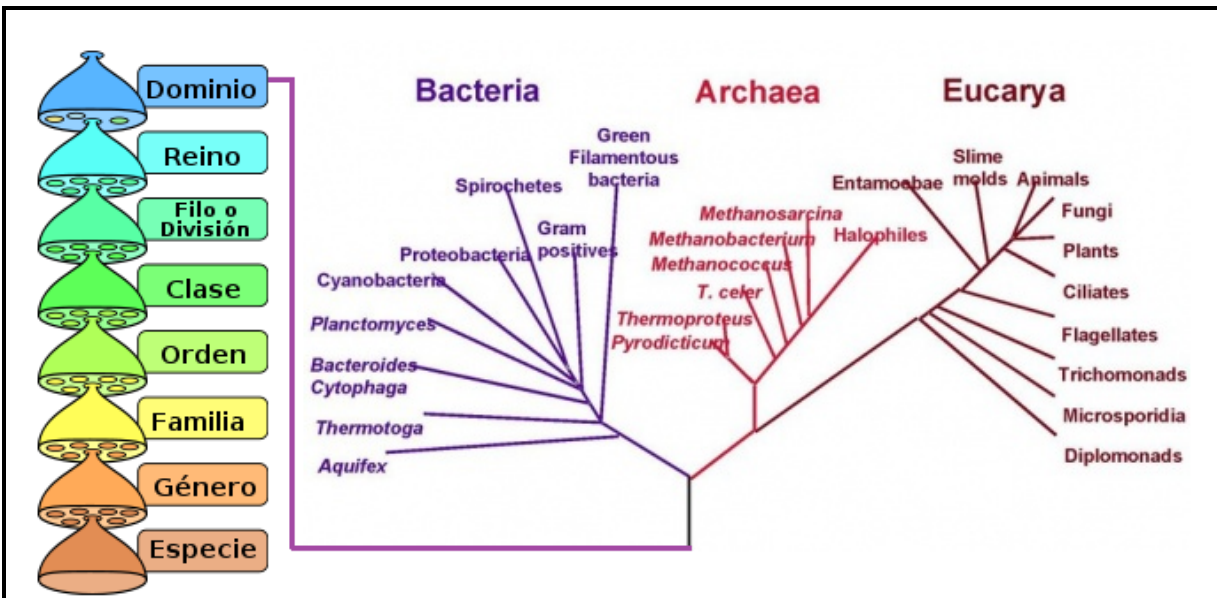


Figura 3. Categorías taxonómicas biológicas, los tres dominios.

(Modificado a partir de: <http://www.sma.df.gob.mx/mhn/index.php?op=04asomate&op01=04> taxonomia y de http://ciclodeque.blogspot.com/2009_09_01_archive.html - Marzo 2011 -)

De acuerdo con el esquema las bacterias conforman uno de los tres dominios y que corresponde (junto a las arqueas) al grupo de organismos celulares conocido como “procariota”. Dentro de este contexto, los actinomicetos resultan ser un grupo heterogéneo de bacterias que presenta la siguiente clasificación taxonómica:

- Dominio/Reino: Bacteria/Eubacteria
 - Filo: Actinobacteria
 - Clase: Actinobacteria

A partir de aquí la clase *Actinobacteria* presenta una gran cantidad de divisiones, presentando varias subclases, órdenes, subórdenes, familias, géneros, especies y subespecies.

Es difícil dar un número concreto para cada categoría taxonómica dentro de esta clase, pues constantemente se descubren o incluyen nuevos miembros dentro de esta clase, se proponen modificaciones y nuevos taxones en donde colocarlos [Stackebrandt *et al.*, 1997; Zhi *et al.*, 2009].

A pesar de que por mucho tiempo se ha considerado a los actinomicetos como parte del reino Fungi y se les sigue estudiando dentro de la micología por su comportamiento micelial, queda claro con los estudios de Woese y colaboradores (1990) y Strackebrandt y colegas (1997) que este grupo constituye una parte importante de los seres procariotes [Woese *et al.*, 1997; Stackebrandt *et al.*, 1997; Whitman *et al.*, 1998; Bonifaz, 2008]. Otros ejemplos de su clasificación dentro de las bacterias son su susceptibilidad a las sulfas y penicilinas, carecer de esterol en la membrana y estudios moleculares empleando el gen 16S ribosomal.

1.2.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction) es una de las técnicas de biología molecular más revolucionarias y versátiles que ha tenido un impacto en la obtención de secuencias del gen 16S. La técnica permite generar múltiples copias de un fragmento de DNA específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de DNA.

Los requerimientos básicos para llevar a cabo una PCR son los siguientes:

- Nucleótidos en el medio donde se encuentra el DNA de interés pues son la materia base para amplificar el mismo.

- Un par de pequeñas cadenas de DNA conocidas como *iniciadores* o *cebadores* que puedan unirse al DNA de cadena sencilla que queremos copiar para que pueda comenzar la replicación (una para cada hebra).
- Enzima termoresistente encargada de hacer la replicación del DNA, la Taq polimerasa (debido a que se aisló de una bacteria llamada *Thermus aquaticus*).
- Mg^{2+} que actúa como el cofactor de la enzima mencionada.

La técnica consta de 3 pasos básicos que forman un ciclo como se describe y esquematiza a continuación (Figura 4):

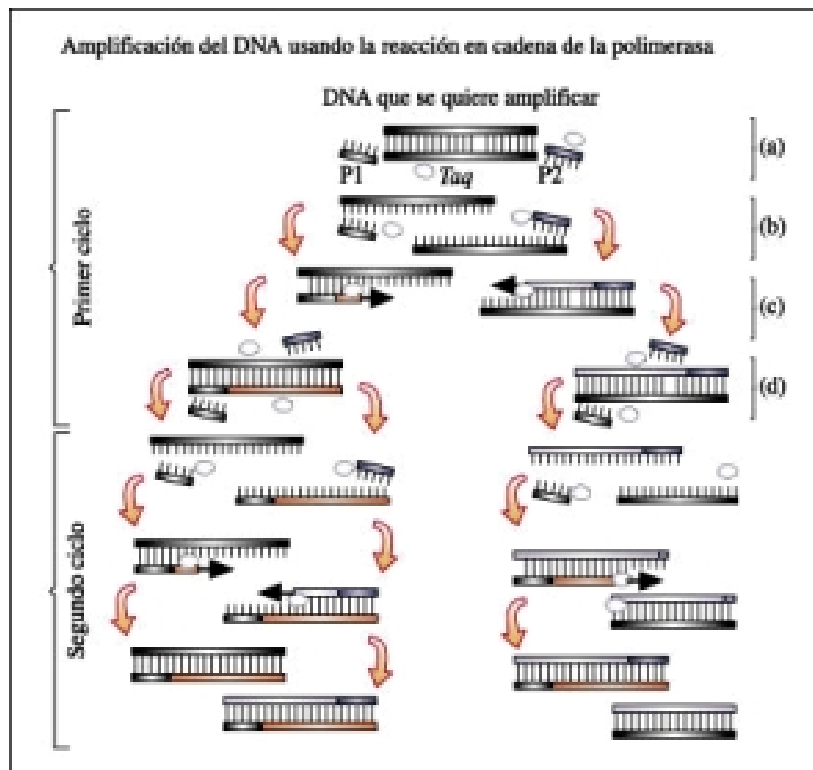


Figura 4. Pasos de una PCR.

(Fuente: <http://www.fitolab.com.mx/fitolabSiteRecs/esquemaPCR.jpg> -Junio 2011-)

- 1- *Desnaturalización*: En esta fase, el DNA se somete a un elevado calentamiento (90-95 °C), lo que desnaturaliza las dobles cadenas en hebras sencillas.

- 2- *Alineamiento*: Este segundo paso disminuye la temperatura (55-60 °C) lo que permite que los iniciadores puedan unirse con su región específica en el DNA a copiar.
- 3- *Extensión*: Nuevamente se eleva la temperatura (70-75 °C) al rango en el que la *Taq polimerasa* tiene su mayor actividad enzimática, lo que le permite generar la cadena complementaria del DNA de interés.

Como resultado de este ciclo se obtienen 2 cadenas a partir de la original, por lo que repitiéndolo se obtiene un incremento exponencial del número de cadenas, lo que con 20 ciclos permite obtener alrededor de 20 millones de copias.

El trabajo de Stackebrandt y colaboradores (1997) resultó pionero debido a que establece claramente el puente necesario entre una herramienta genotípica (secuencias del gen 16S ribosomal) y las características quimiotaxonómicas de los grupos estudiados. Entre las distintas propiedades quimiotaxonómicas que han sido evaluadas a lo largo del tiempo e historia de los actinomicetos se encuentran aquellos estudios de los componentes de la pared celular, de los cuales se desglosa un poco más por su importancia para el presente trabajo de investigación.

1.2.3 PARED CELULAR Y ÁCIDO DIAMINOPIMÉLICO

La clase *Actinobacteria* es considerada como bacterias Gram positivas (+), lo cual se debe a la composición de su pared bacteriana y que además presenta propiedades que la hacen muy importante para la caracterización de esta clase.

La pared celular de los actinomicetos, como la de todas las bacterias Gram + se compone principalmente de una gruesa capa compuesta de varias láminas de peptidoglicano o mureína, un heterodímero que alterna moléculas de NAG y de NAM (N-AcetilGlucosamina y ácido N-AcetilMurámico respectivamente), además

de otros azúcares en forma minoritaria como son glucosa, arabinosa, galactosa, y manosa [Goodfellow & O'Donnell, 1993].

A su vez, las láminas de peptidoglicano se unen entre sí por medio de puentes peptídicos unidos a las moléculas de NAM, estos péptidos se entrecruzan unos con otros, lo que a su vez une las láminas de peptidoglicano generando una red tridimensional. En el caso de las bacterias Gram +, el puente es un pentapéptido que presenta los siguientes aminoácidos: L-alanina, D-iso ácido glutámico, un aminoácido tipo diamino, D-alanina y D-alanina como aminoácido terminal (Figura 5).

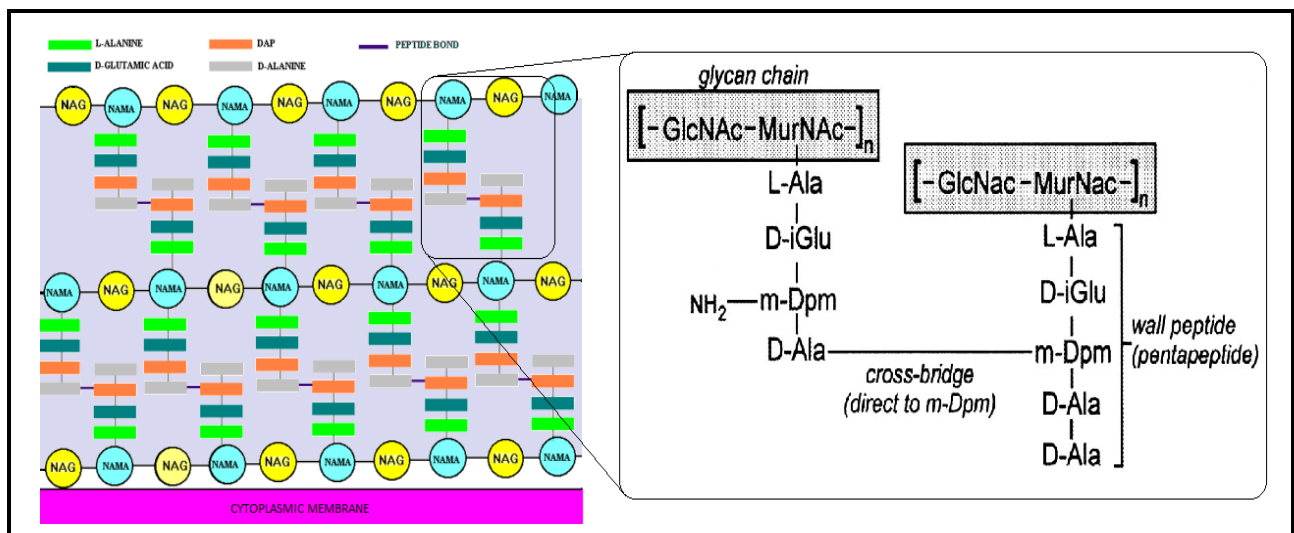


Figura 5. Pared celular de bacterias Gram positivas con DAP en su pentapeptido. (Fuente/adaptado: University of Texas-Houston Medical School / Wiley y Schneewind, 1999).

Los aminoácidos que son esenciales para el entrecruzamiento son el aminoácido tipo diamino que figura en la tercera posición y que varía de especie en especie, en el caso de paredes Gram + puede ser: L-alanina, L-lisina, L-ácido glutámico, L-ornitina, L-homoserina, L-ácido diaminobutírico o DAP) [White, 2007] y en la cuarta posición del puente vecino la D-alanina (Figura 6).

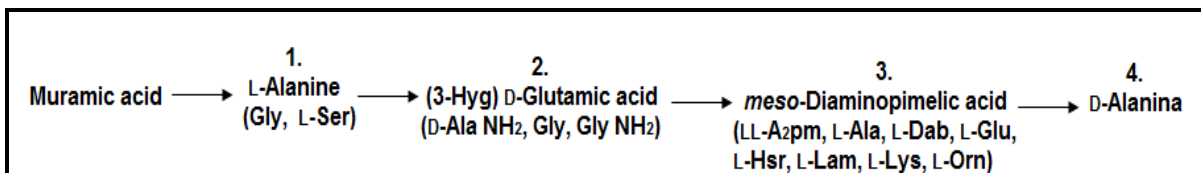


Figura 6. Algunas variaciones en las subunidades del péptido en bacterias Gram + (Fuente/adaptado: Goodfellow & O'Donnell, 1993).

La identificación de los componentes de la pared celular permiten una caracterización bacteriana basada en un enfoque quimiotaxonómico, especialmente para bacterias Gram +. La determinación de los azúcares presentes y del isómero del ácido 2,6-DiaminoPimélico (DAP del inglés Diamino Pymelic Ácid) permiten una primera clasificación para establecer la identidad de algunos grupos bacterianos, y sobre todo de actinobacterias.

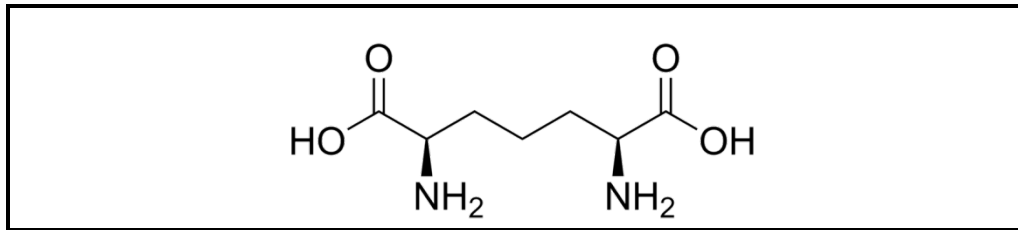


Figura 7. Estructura general del DAP.

(Fuente: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Diaminopimelic_acid.png - Marzo 2011-)

El DAP es un aminoácido derivado de la L-Lisina que presenta 2 centros quirales y un plano de simetría, por lo tanto presenta isomería óptica como un enantiómero o como un diastereoisómero. Si ambos centros desvían la luz polarizada en dirección contraria a las manecillas del reloj (*Levogiro*) el isómero se denomina LL, y si los centros desvían la luz en sentidos opuestos, resultando inactivos ópticamente hablando, se le denomina compuesto *meso*. Al ser un derivado de la L-Lisina es improbable que exista el isómero DD [McMurry, 1995].

La determinación del DAP consiste en la separación cromatográfica de los componentes de la pared celular, lo que permita identificar el isómero del DAP que se encuentre presente en dicha bacteria ya que cada isómero tiene una migración ligeramente diferente al realizar, por ejemplo, una cromatografía en capa fina (TLC del inglés Thin Layer Chromatography).

El DAP es un aminoácido que tiene diferentes isómeros y por ello sirve para la caracterización quimiotaxonómica, en especial de la clase *Actinobacteria*, dividiendo su pared en cuatro tipos diferentes al juntarse con el estudio del tipo de azúcar que pudiera estar presente también en la pared. Sin embargo, para algunos grupos de actinomicetos como lo es el género *Streptomyces*, la

caracterización del isómero del DAP facilita su identificación pues solamente cuentan con la forma LL mientras cualquier grupo que muestre la forma *meso* se le denomina generalmente “actinomiceto raro”. Las características completas del estudio de Lechevalier y colaboradores (1970) se pueden resumir en la tabla 1. [Lechevalier *et al.*, 1970]. La clasificación original propuesta en 1970 tenía en total 10 tipos diferentes de paredes de las cuales el resto no toma en cuenta el DAP y por ello se mencionan.

Tabla 1. Características de los tipos de pared celular de actinomicetos.

Pared celular	Glicina	Meso-DAP	LL-DAP	Otros azúcares	Ejemplos
I	+		+		<i>Streptomyces</i>
II	+	+*		Arabinosa, Xilosa	<i>Micromonospora</i>
III		+		Madurosa	<i>Actinomadura</i>
IV		+		Arabinosa, Galactosa	<i>Mycobacterium</i> <i>Nocardia</i>

* meso-hidroxi también puede estar presente
(Fuente/adaptada: Logan, 1994).

En el caso de algunos actinomicetos, el peptidoglicano puede encontrarse acompañado de ácidos teicoicos y/o lipoteicoicos en gran cantidad (30-60%) [Neuhaus & Baddiley, 2003], e incluso por otros glicolípidos como ceras y los ácidos micólicos que les brindan a estos géneros en particular propiedades de Ácido-Alcohol Resistencia (*Nocardia*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella* y *Micobacterium*) [Murray *et al.*, 2007].

1.2.4 EL GÉNERO *STREPTOMYCES*

Los estreptomycetos abarcan el mayor porcentaje de los actinomicetos aislados de cualquier ecosistema y a la fecha el género tiene alrededor de 600 especies [Euzéby, 2012]. Este género de bacterias Gram positivas y heterótrofas

común e históricamente han sido aisladas de suelo, a pesar de que habitan ambientes muy diversos. Por ejemplo en el caso de los sedimentos marinos también representan el mayor porcentaje de actinomicetos que se recupera normalmente.

El género *Streptomyces* cuenta con el número más extenso de especies que presentan en su pared el isómero LL del DAP. La importancia en el estudio de los estreptomicetos es debido a la innata producción de metabolitos secundarios, entre los que destacan los antibióticos. A la fecha, se han aislado más de 2000, lo que representa aproximadamente el 17% del total de los antibióticos de origen bacteriano para el consumo humano. A pesar de esta importancia, también se les emplea en industrias como la agricultura (procesos de fertilización) por su gran capacidad de degradación de compuestos carbonados variados en condiciones de pH considerablemente alcalinas [Lombó *et al.*, 2009], y en la industria biotecnológica en la producción de proteínas recombinantes humanas [Fogarty & Kelly, 1990]. Irónicamente, a pesar del extenso trabajo sobre ellos en investigación y a las inversiones multimillonarias en las que se ven involucrados en la industria, no se ha llegado a comprender bien la ecología del género, sin embargo se sabe que juegan un papel muy importante como reguladores de comunidades microbianas (equilibrio biocenótico) [Madigan *et al.*, 2004].

Los estreptomicetos se distinguen por presentar un olor característico, que es debido a la producción de un metabolito volátil derivado del terpeno, “la Geosmina”, que proporciona el característico olor a tierra mojada. Otras de sus características, y que son propias de su género, son la tendencia a formar filamentos extensivamente ramificados de entre 0.2 y 0.5 μm de grosor, y a producir colonias características con una apariencia que se describe como aterciopelada y polvosa o rugosa, donde a la vez pueden observarse zonas en desarrollo, zonas desarrolladas y zonas con esporulación, muchas veces con distintos colores debido a que producen también pigmentos dependiendo del

estrés bajo el que se encuentre el micelio, la edad de la colonia y de la cantidad de nutrientes del medio.



Figura 8. Diversas imágenes del género *Streptomyces*.

(Modificado a partir de: <http://www.leidenuniv.nl/en/researcharchive/index.php3-c=489.htm>, http://www.scharfphoto.com/fine_art_prints/archives/199901-008-Streptomyces.jpg y <http://archive.microbelibrary.org/microbelibrary/files/cclimages/Articleimages/Atlas-Gram/Streptomyces%20species%20fig13.jpg> -marzo 2011-).

El género *Streptomyces* presenta un ciclo de vida en el que esporulan constantemente como vía de proliferación y diversificación. En ciertas partes de este ciclo de vida es cuando producen una especie de micelio, en sus dos modalidades: el micelio aéreo y el micelio vegetativo. Ambos tipos de micelio pueden estar presentes al mismo tiempo en una colonia de este género, lo que depende de su edad y de las condiciones del medio, a esta fase se le conoce como estacionaria. De hecho se considera que es en esta fase estacionaria cuando se forman los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana [Contreras, 2011]. La explicación de esta teoría es que cuando el micelio aéreo se diferencia para comenzar con la formación de esporas, el micelio de sustrato debe morir y fragmentarse primero, liberando nutrientes al medio que serán aprovechados con el fin de favorecer la diferenciación hacia las esporas. En este momento es cuando la producción de antibióticos se ve favorecida porque ayudan a reducir la competencia por estos nutrientes con microorganismos cercanos [Contreras, 2011].

Finalmente tenemos que mencionar que la mayoría de las especies de estreptomicetos son saprofitas para el ser humano, salvo algunas excepciones

de especies patógenas que producen actinomicetoma, la forma más frecuente del micetoma en México [Bonifaz, 2008]. En el 2007, Quintana y colaboradores describieron casos de actinomicetoma en el Sudán por una nueva especie de *Streptomyces*, *S. sudanensis*, pero su relevancia en casos del país queda aún por ser establecida [Quintana *et al.*, 2007].

1.2.5 ACTINOMICETOS “RAROS”

Los denominados actinomicetos raros (Lazzarini *et al.*, 2000) involucran casi todos aquellos géneros distintos a *Streptomyces* dentro de la clase *Actinobacteria*. Una de las pocas características distintivas que presentan casi todos los miembros de este grupo “informal” dentro de los actinomicetos es que casi cualquier miembro tiene un tipo de pared celular que encaja con la tabla 1, pues cuentan con el DAP de tipo *meso*.

Varios de los géneros que se encuentran dentro de esta categoría se conocen desde hace mucho tiempo como *Mycobacterium* (conocido clásicamente como el bacilo de Koch), mientras que muchos otros apenas están siendo descubiertos y la gran mayoría al parecer aun espera a ser caracterizado. Debido a que históricamente con mucha mayor frecuencia se aislaban cepas de *Streptomyces*; el conocimiento sobre el hábitat, la fisiología y la producción de moléculas bioactivas de actinomicetos raros actualmente se incrementa de manera gradual [Seong *et al.*, 2001; Lazzarini *et al.*, 2000].

De hecho, es precisamente por su importancia clínica que varios géneros y especies de “actinomicetos raros” se conocen ampliamente, ya sea por los beneficios que pueden producir (casi la mitad de la producción total de antibióticos de origen microbiano corresponde a diversos miembros de este grupo) y por el contrario, por lo perjudicial que pueden resultar (enfermedades causadas de

manera directa como son los actinomicetomas o de manera indirecta como el botulismo causado por la toxina de *C. botulinum*).

La tendencia actual por lo tanto se centra en la búsqueda de nuevos miembros de esta clase y en la posterior evaluación de moléculas bioactivas que produzcan; innumerables ejemplos se han producido en los últimos años (*S. tropica* y salinisporamida A, *S. chibaensis* y resistoflavina, *Marinispora* y marinomicina A, etc.) y al parecer más aparecerán en los próximos años [Bhatnagar & Kim, 2010] [Gulder & Moore, 2010].

Finalmente hay que mencionar que como ya habíamos dicho previamente los diferentes géneros de actinomicetos presentan diferencias en el micelio aéreo que producen, por ejemplo en el caso de *Nocardia* este es escaso y en el caso de *Micromonospora* este no se presenta.

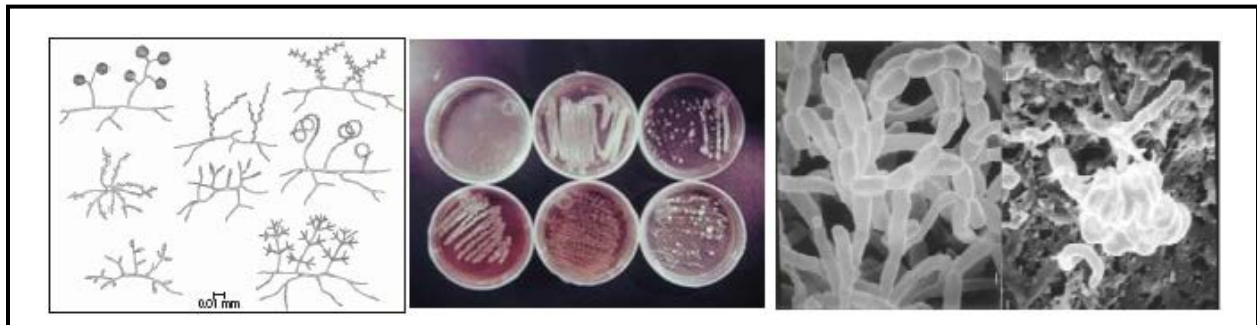


Figura 9. Diversas imágenes de actinomicetos raros.

(Modificado a partir de: <https://attra.ncat.org/images/suelos/actino2.gif>, http://bp3.blogger.com/_ZGSPKYany9s/RsRtc_OeARl/AAAAAAAAAD4/qiDn1Gk5l54/s1600-h/actinomicetos2.jpg y <http://www.gbif-prokarya.de/microorganisms/wink.html>; Miyado *et al.*, 2002).

1.3 COMPUESTOS BIOACTIVOS DE ORIGEN MICROBIANO

La biotecnología pretende hacer uso de la biodiversidad para producir o modificar sustancias útiles, por ello, la relación entre biodiversidad y biotecnología es bastante estrecha [Mikán y Castellanos, 2004]. En este sentido, las bacterias son un grupo bien aprovechado en industrias relacionadas con la biotecnología. Debido a que han sido y son altamente explotados en estas industrias, la cantidad de compuestos bioactivos que han producido históricamente es inmensa, lo que sin duda ha contribuido significativamente al bienestar de la humanidad y al espectacular aumento de la esperanza de vida observado durante la segunda mitad del siglo XX.

La razón del gran peso que tienen las bacterias en estas industrias no solo deriva de su elevada presencia en todos los ecosistemas, sino que también es debida a la elevada tasa de mutación que estos microorganismos presentan (mutaciones espontaneas en el orden de 10^{-7} a 10^{-12}) [Brooks *et al.*, 2008], ya sea de tipo horizontal (uso de plásmidos) o de tipo vertical (reproducción), lo que deriva en la posibilidad de encontrar, ya sea de forma natural o por procesos de modificación genética, rutas bioquímicas únicas que deriven en la producción de metabolitos secundarios de interés que pueden aislarse, modificarse de ser necesario, y purificarse; o también encontrarse con bacterias cuyas rutas metabólicas permitan modificar compuestos que de otra forma resultaría muy costoso o prácticamente imposible de realizar, por ejemplo como estrategia de biorremediación.

Curiosamente la enorme diversidad de estructuras químicas observada entre los metabolitos de origen microbiano derivan de un número relativamente pequeño de rutas biosintéticas básicas (principalmente poliquétidos, péptidos no ribosomales, terpenoides y sus posibles combinaciones), pero que se han diversificado enormemente durante el curso de la evolución por las razones ya mencionadas atribuidas a las variaciones genéticas de estos seres.

En el caso de la industria farmacéutica, los compuestos bioactivos bacterianos han representado históricamente una amplia fuente de principios activos novedosos. Esto se ha utilizado en infecciones. Éstos se obtienen de manera más sencilla y económica en comparación con otros procesos de desarrollo de fármacos, como son la síntesis dirigida o el rastreo sistemático [Avedaño, 2001].

La mayoría de estos compuestos son agentes quimioterapéuticos y de ellos el mayor porcentaje corresponde a distintos tipos de antibióticos. En este sentido la búsqueda de nuevos productos con actividad antimicrobiana es un área que ha evolucionado de forma intensa, y que debería de satisfacer la creciente demanda en el área de salud pública ante la presencia alarmante, no solo de cepas multiresistentes de los patógenos más importantes, sino también de enfermedades infecciosas nuevas y/o re-emergentes, sin embargo como hemos venido comentando en nuestro país es un terreno que es poco explotado.

La mayoría de las moléculas bioactivas empleadas como fármacos que son producidas por bacterias provienen principalmente de bacterias esporuladas (*Bacillus*), mixobacterias y actinomicetos (una cantidad de géneros relativamente baja si consideramos el amplio mundo microbiano). De hecho, la mayoría de los antibióticos y antineoplásicos son producidos por actinomicetos. Algunos ejemplos de estos compuestos bioactivos se muestran en la tabla 2.

Por el otro lado, los productos bioactivos que son obtenidos a partir de cepas bacterianas modificadas involucran una variedad de compuestos mucho mayor que los obtenidos por cepas de manera natural. Ejemplo de la variedad de compuestos obtenidos de bacterias modificadas por ingeniería genética son algunas hormonas como: insulina, HGH, EPO), vitaminas como: B₂, B₁₂, enzimas como: isomerasas, lignasas y solventes, vacunas (antígenos bacterianos y virales) y antineoplásicos [Fogarty & Kelly, 1990].

Tabla 2. Algunos fármacos producidos por bacterias y su aplicación.

Fármaco(s)	Actividad	Bacteria productora
Variacina	Antibacteriano	<i>Kocuria varians</i>
Cloranfenicol		<i>Streptomyces venezuelae</i>
Ácido clavulánico		<i>Streptomyces clavuligerus</i>
Bacitracina		<i>Bacillus licheniformis</i>
Polimixina B		<i>Bacillus polymyxa</i>
Lincomicina		<i>Streptomyces lincolnensis</i>
Eritromicina		<i>Saccharopolyspora erythraea</i>
Estreptomicina		<i>Streptomyces griseus</i>
Rifampicina B		<i>Amycolatopsis rifamycinica</i>
Tetraciclina		<i>Streptomyces viridifaciens</i>
Mupirocina		<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Gentamicina		<i>Micromonospora purpureochromogenes</i>
Sisomicina		<i>Micromonospora inositola</i>
Vancomicina		<i>Amycolatopsis orientalis</i>
Aztreonamina		<i>Chromobacterium violaceum</i>
Neomicina	<i>Streptomyces fradiae</i>	
Nistatina	Antifúngico	<i>Streptomyces noursei</i>
Anfotericina B		<i>Streptomyces nodosus</i>
Tiobutacina		<i>Lechevalieria aerocolonigenes</i>
Pimaricina		<i>Streptomyces natalensis</i>
Ivermectina	Antiparasitario	<i>Streptomyces avermitilis</i>
Tacrolimo	Inmunosupresores	<i>Streptomyces tsukubaensis</i>
Rapamicina		<i>Streptomyces hygroscopicus</i>
Espergualina		<i>Bacillus laterosporus</i>
Actinomicina D	Antitumorales y/o antineoplásicos	<i>Streptomyces sindenensis</i>
Bleomicina A		<i>Streptomyces verticillus</i>
Mitramicina		<i>Streptomyces argillaceus</i>
Doxorubicina (adriamicina)		<i>Streptomyces peucetius</i>
Tetrahidroliptastina	“Antidiabético”	<i>Streptomyces toxytricini</i>

(Fuentes: Blanco *et al.*, 2010; Peláez & Genilloud 2004, Pridmore *et al.*, 1996, Prudhomme *et al.*, 2008, Lombó *et al.*, 1999).

Existen otras posibilidades para producir los metabolitos que produce una bacteria de forma natural, pero en cantidades mucho mayores. La mayoría de los antibióticos indicados en la tabla 2 se producen en la actualidad por cepas mutantes de su productor. También se puede inducir en una clona mutante la producción del metabolito de interés con una ligera modificación, lo que en el caso de los antibióticos genera familias completas de ellos, y además resulta más sencillo que realizar síntesis de análogos por métodos orgánicos.

Debemos comprender que la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana son procesos que de manera natural son energéticamente costosos para las células procariotas capaces de hacerlo y que se producen para inhibir al resto de la biota solo en su periferia, por lo que no es necesario que produzcan estos compuestos en gran cantidad. Esta es la razón de porque la baja producción del metabolito de interés en las bacterias en su hábitat natural y de que sea mucho más rentable inducir su sobreexpresión [Wheelis, 2008].

Finalmente vale la pena mencionar que la variedad de géneros y especies utilizados en la producción de estas moléculas también involucra una cantidad de especies limitada, en este caso debido a que una misma especie puede producir varios compuestos de utilidad dependiendo de las modificaciones genéticas que se les hagan (cepas modificadas de *Escherichia coli* o de *Bacillus subtilis* son, aunque no las únicas, si las más ampliamente usadas en ingeniería genética).

1.4 AISLAMIENTO DE ACTINOMICETOS A PARTIR DE SEDIMENTOS MARINOS Y SU CARACTERIZACIÓN

Una de las formas más empleadas para buscar actinomicetos marinos, es el análisis de los sedimentos debido a su mayor riqueza en sustancias orgánicas, lo que aumenta la posibilidad de obtener biomasa. Para ello, es necesario contar con un navío especializado y equipado para este propósito. Un método excelente para obtener el sedimento consiste en el uso de un taladro, de acero inoxidable y previamente esterilizado [Seong *et al.*, 2001; Figura 2].

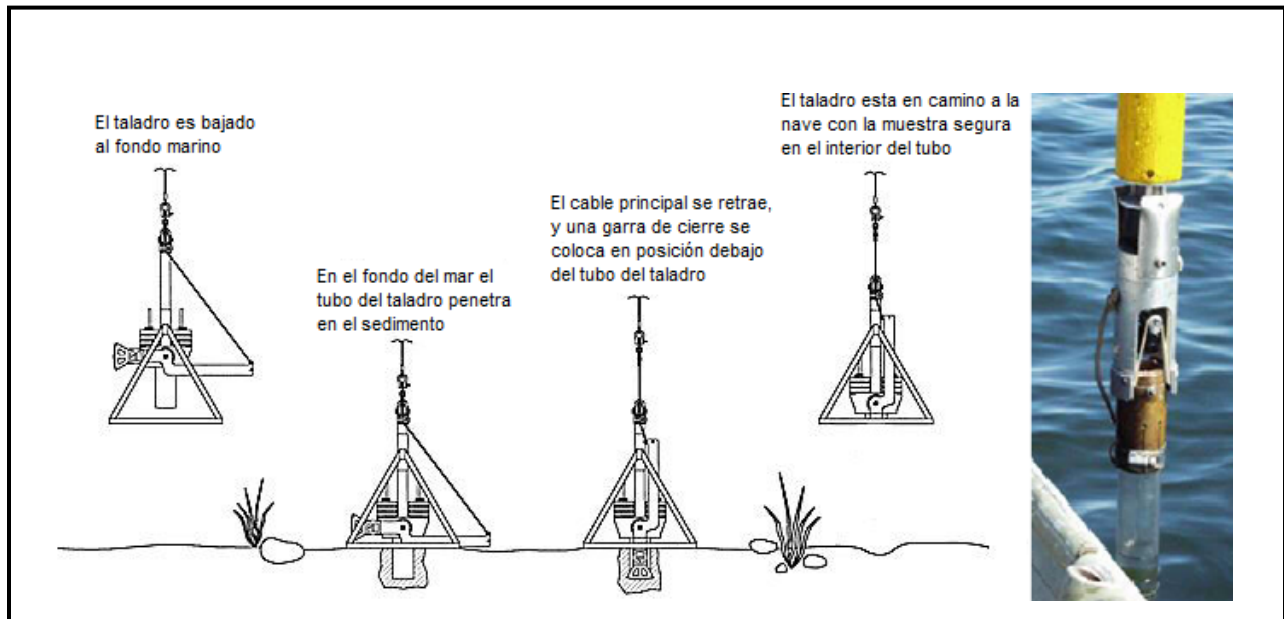


Figura 9. Funcionamiento de un taladro (Box Corer de KC®) en sedimento marino. (Fuente/Adaptado: http://www.kc-denmark.dk/public_html/p2.htm -Marzo 2011-).

Las muestras después pueden colocarse en bolsas asépticas, para cultivar a los microorganismos presentes en ellas lo más pronto posible, ya que la cantidad de especies que pueden recuperarse disminuye rápidamente, especialmente en el caso de microorganismos autóctonos que no soportan los cambios en las condiciones fisicoquímicas de su medio al salir a la superficie. Para ello una metodología útil consiste en primero hacer un tratamiento que deshidrate el sedimento (por ejemplo utilizar una campana de flujo laminar) para luego

pulverizarlo y poder inocular diversos medios de cultivo por el método de estampado, utilizando una esponja estéril. [Mincer *et al.*, 2002].

El siguiente paso en la obtención de actinomicetos a partir de estos sedimentos consiste en enriquecer el número solo de las cepas de interés y de la capacidad de aislarlas a partir de otras presentes en el sedimento. Para solucionar esta problemática la siembra de los microorganismos debe tomar en cuenta el uso de ciertas metodologías, como son por ejemplo el llevar a cabo diluciones seriadas en medios líquidos y obviamente una resiembra que permita obtener colonias aisladas como lo es la siembra por agotamiento. Estas colonias independientes pueden ser recogidas nuevamente y ser resembradas en otro medio de cultivo. Este medio de cultivo, de ser posible debe depender de las características y requerimientos nutricionales del microorganismo de interés [Brooks *et al.*, 2008]. El uso de medios preparados con agua marina, o el uso de medios con una determinada concentración de antimicótico para evitar contaminaciones, pueden resultar estrategias especialmente útiles en este caso.

Una vez aisladas las colonias de interés prosigue la caracterización de dichos microorganismos. Una parte integral para identificar microorganismos es el empleo de pruebas que determinen características fenotípicas y genotípicas de los mismos, como son la determinación del isómero de DAP presente en la pared o una PCR con iniciadores específicos de la clase *Actinobacteria*.

Es decir, que para la caracterización de los microorganismos debemos analizar características como son estructura celular, metabolismo o con base en diferencias en determinados componentes como ADN, ácidos grasos o quinonas, por mencionar algunos ejemplos [Thomson & Bertram, 2001].

La caracterización microbiana que se utiliza para la identificación de tipos bacterianos pertenecientes a la misma especie y que presentan solo pequeñas diferencias en sus características fenotípicas y genotípicas es una metodología

conocida como tipificación. Un ejemplo de tipificación microbiana aparece en el análisis epidemiológico de cepas. Algunos ejemplos de técnicas de tipificación fenotípicas empleadas en este análisis son el biotipado, el antibiotipado, el serotipado o el fagotipado, y un ejemplo de técnica genotípica de tipificación es la amplificación de secuencias específicas de las cepas [Castellano *et al.*, 2009]. La única diferencia con el ejemplo de las cepas patógenas y la caracterización de aislados esta en las técnicas que se utilizan y que nos permiten estudiarlos con diversos enfoques. Este tipo de enfoques que se usan con gran aceptación para el caso de los actinomicetos pueden dividirse en tres tipos principalmente: El enfoque clásico, el enfoque quimiotaxonómico y el enfoque molecular [Stackebrandt *et al.*, 1997].

El enfoque clásico para la clasificación microbiológica de cepas nuevas involucra características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Pero como su nombre lo indica ya no basta en la actualidad para lograr una diferenciación porque no permite distinguir especies bacterianas nuevas de otras ya conocidas, y más bien se utiliza como una primera clasificación, que a veces permite conocer el género y especie de las cepas de interés.

Por su parte el enfoque quimiotaxonómico involucra estudios y técnicas analíticas que dependen de las variaciones químicas en la morfología de los microorganismos, por ejemplo, la determinación de enzimas u otros componentes proteicos (por su actividad enzimática, punto isoelectrico, etc.), de ácidos grasos o de lípidos polares [Seong *et al.*, 2001]. Sin embargo tampoco son determinaciones que permitan discriminar plenamente entre especies.

El enfoque molecular o genético por su parte es el análisis más potente de los tres ya que se basa en el secuenciamiento del código genético de las cepas, lo que también permite conocer las relaciones filogenéticas entre integrantes de géneros distintos que estén muy relacionados. Por lo tanto es el único enfoque útil para obtener una discriminación precisa entre especies muy relacionadas [Murray *et al.*, 2007].

2) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La terapia de elección contra diversas enfermedades infecciosas de tipo bacteriano es el uso de antibióticos. Sin embargo el uso indiscriminado de estos en la clínica constantemente permite la proliferación de cepas nuevas y/o reemergentes multi-resistentes a los regímenes actuales de dosificación. Para solucionar esta problemática existe una serie de estrategias que se llevan a cabo en diversos sectores, como son la concientización de pacientes y médicos sobre el uso de los antibióticos.

Como Q.F.B. uno de nuestros papeles en la solución de esta problemática consiste en la búsqueda constante de nuevos antibióticos. Una de las fuentes más importantes de nuevos antibióticos está en la detección de fuentes naturales, particularmente seres vivos, que produzcan este tipo de moléculas. El caso de antibióticos producidos por microorganismos históricamente se relaciona con una clase bacteriana en particular: la clase *Actinobacteria*.

Debido a las características particulares de los actinomicetos el aislamiento y caracterización de nuevas especies conlleva una alta posibilidad de obtener nuevos antibióticos. A los actinomicetos clásicamente se les aísla de la tierra, sin embargo su búsqueda a partir de sedimentos marinos brinda la posibilidad de encontrar nuevas especies, con un metabolismo diferente a los aislados terrestres, y por ende, con posiblemente nuevos metabolitos bioactivos que sirvan en la terapia.

2.1 OBJETIVOS

- Realizar una caracterización quimiotaxonómica y molecular de una serie de aislados microbianos, para corroborar su identidad como miembros de la clase *Actinobacteria*.
- Determinar si los actinomicetos aislados presentan, o no, una actividad inhibitoria contra alguna(s) cepa(s) de referencia de géneros considerados como patógenos oportunistas en la clínica y que dicha inhibición pueda atribuirse únicamente a la presencia del aislado de actinomiceto.
- Si se presenta una actividad antibiótica por parte de los aislados, evaluarla con el fin de determinar su espectro de acción y si alguna característica de los aislados es condicionante de esto, además, de ser posible obtener indicios sobre el mecanismo de acción de la presunta molécula bioactiva.

2.2 HIPÓTESIS

- La caracterización de los aislados comprobará que estos corresponden a microorganismos de la clase *Actinobacteria*.
- La evaluación de la actividad antimicrobiana permitirá determinar si los aislados de actinomiceto son potenciales productores de metabolitos bioactivos, incluyendo antibióticos; también permitirá determinar si los aislados requieren una caracterización a nivel de género y especie.

3) MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó en total con 24 aislados con características coloniales macroscópicas típicas de la clase *Actinobacteria* (secas, duras, hundidas en el agar, algodonosas y/o esporuladas). La evaluación de la actividad antibacteriana se realizó con el 50% del total de los aislados seleccionados aleatoriamente.

3.1 CRECIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE RECURSOS MICROBIANOS

Debido a que el crecimiento de los aislados varía entre 5 y 10 días de incubación a 30 °C (Incubador Lab-Tech) y el correspondiente de las cepas de referencia entre 2 y 3 días a 28 °C (Incubadora Incu-Max IC150, Amerex Instruments, Inc.), los experimentos se realizaron ajustando los días para que en lo posible aislados y cepas tuvieran un desarrollo óptimo similar.

Para el uso y conservación de los aislados se utilizaron cuatro diferentes metodologías. Éstas se describen brevemente en la siguiente tabla:

Tabla 3. Metodologías comunes para conservación de cepas microbianas.

Metodología	Plazo	Viabilidad	Medios
1. Transferencia periódica (cultivo en placa)	Corto	Semanas	GYM, GYEA, OA
2. Suspensión en medio líquido	Mediano	Meses	GYM
3. Cultivo inclinado en tubo			YEME
4. Congelación en tubos con glicerol	Largo	Años	-

Para el caso de las cepas de referencia estas se conservaron a corto plazo en medio Base para Gelosa Sangre y para la determinación de la actividad antibacteriana se utilizó medio Mueller-Hinton.

Los medios de cultivo se prepararon pesando todos los componentes (Difco), el agar (BD) y las sales (Sigma-Aldrich) en una balanza analítica (Pioneer, Ohaus). Posteriormente se mezclaron y disolvieron con agua bidestilada en agitación constante utilizando una parrilla (Stirrer PC-353, Corning). Para el caso de los medios Base para Gelosa Sangre y Mueller-Hinton se requiere un calentamiento previo a ebullición por 1 minuto; posteriormente se determina el pH con un potenciómetro (pHmeter model 7, Corning) y de ser necesario se ajusta al pH indicado para cada medio con gotas de HCl o de NaOH según sea el caso, excepto con el medio GYM que utiliza KOH para alcalinizar el pH.

El medio se vacía en frascos de precipitado con rosca de 500 o 250 mL (Pyrex) y se esteriliza en autoclave (Sterilmatic, Merket Forge Industries Inc) durante 15 minutos, a 121 °C y 15 lb de presión. El medio se enfría aproximadamente a 45 °C y se vacía en cajas Petri o tubos universales Falcón en campana de flujo laminar (CFLV130). Para el caso de medio líquido, éste se vacía en matraces Erlenmeyer.

Además se realizó un cultivo adicional en medio Agar Avena (OA, del inglés oatmeal) para 12 de los aislados seleccionados aleatoriamente. 2 o 3 cubreobjetos estériles se colocaron de manera inclinada en el medio antes de inocular a los aislados. Este procedimiento permite una mejor observación de las pseudo-hifas y de las esporas una vez que estas han desarrollado sin necesidad de utilizar tinciones, observando al microscopio (Motic) dichos cubreobjetos.

3.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS

- Caracterización clásica: Observación del Gram

Biomasa de cada cepa se tomó en condiciones de esterilidad y se colocó sobre portaobjetos para realizar el frotis correspondiente. Éste se fijó pasándolo bajo la flama de un mechero Bunsen (2 o 3 veces de manera rápida). Se agregaron gotas del colorante primario, cristal de violeta, y se dejó actuar por un minuto, se eliminó el exceso con agua destilada y se agregó lugol como agente mordente dejándolo actuar también durante un minuto, el exceso se eliminó y se enjuagó con agua, se agregaron gotas de la solución lavadora alcohol-acetona e inmediatamente se enjuagó con agua, finalmente se agregó el colorante de contraste, safranina, que se dejó actuar por un minuto, el exceso se eliminó e inmediatamente se lavó con agua. El Gram se determinó observando las preparaciones bajo el microscopio con el objetivo 100X. El Gram se reportó como positivo si las bacterias se tiñeron con el colorante primario (morado).

- Caracterización quimiotaxonómica: Determinación del isómero del DAP

Para cada cepa se preparó un tubo con rosca de 1.5 mL estéril se le agregaron 500 μ L de HCl 6 N (J. T. Baker) y 150 μ g de perlas de vidrio (SIGMA 106). Después se agregaron dos asadas de biomasa (todo en condiciones de esterilidad). Los tubos se mezclaron en Vortex (VortexMixer, Labnet) por 5 minutos y se colocaron en horno de convección (Felisa) a 100 °C por 4 horas. Posteriormente los tubos se enfriaron y centrifugaron (Mini Spin Plus, Eppendorf) 5 minutos a 6000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo de 1.5 mL (Eppendorf) y se colocó en parrilla de calentamiento (Multi-BloK Heater, Barnstead Lab Line) a 100 °C hasta evaporación a sequedad. Una vez fríos los tubos se rehidrataron con 500 μ L de agua destilada y se repitió la evaporación 2 veces más. Finalmente, los hidrolizados se reconstituyeron con 100 μ L de agua destilada estéril.

1 μL del extracto de cada cepa se colocó en la base de una placa de cromatografía en capa fina (TLC -del inglés Thin Layer Chromatography; MERK). La muestra se secó con aire caliente para evitar la extensión de la muestra. Este paso se repitió 2 veces más. Se colocó 1 μL de estándar de DAP y la placa se colocó en un tanque de revelado (Sigma-Aldrich) con una mezcla de Metanol:H₂O:HCl:Piridina (80:26:4:10) como eluyente y se dejó eluir por 5 horas. La placa se retiró del tanque, se dejó secar y se roció con una solución de Ninhidrina (al 0.2% disuelta en acetona). La placa se dejó secar y se colocó sobre una parrilla de calentamiento a 100 °C por 5 minutos o hasta que revelaron.

La interpretación del DAP se realizó comparando el DAP de cepas de referencia y del estándar de Sigma, identificando los posibles isómeros de la siguiente manera: 1) Línea 1, isómero LL, 2) Línea 2, isómero meso y 3) isómero meso-OH y de acuerdo a su r_f . La posición de cada uno de los isómeros se muestra en la siguiente figura.

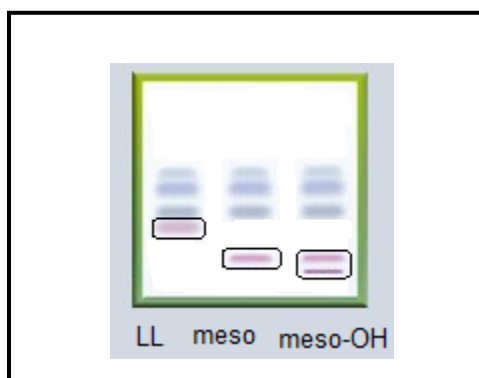


Figura 10. Placa de TLC con los isómeros del DAP.

(Modificado a partir de: <http://www.tecrom.com/es/catalog/cromatograf%C3%AD-en-capa-fina-tlc>.
TECROM® - marzo 2011 -)

- Caracterización molecular: Extracción y amplificación del DNA

Por cada cepa de se preparó un tubo Eppendorf de 1.5 mL con 100 μg de perlas de vidrio y 500 μL de buffer GTE (Glucosa-Tris-EDTA; pH 8.0). Posteriormente se colocaron 2 asadas de biomasa de cepas. Los tubos se

mantuvieron a 4 °C por 12 horas. Los tubos se agitaron con un Vortex a máxima velocidad por 15 minutos, después se centrifugaron a 14,500 rpm por 15 minutos y el sobrenadante se transfirió (entre 300 y 400 µL) a un segundo tubo Eppendorf. Se agregó el mismo volumen una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol *iso*-amílico (24:24:1), se agitó rápidamente en Vortex por 5 segundos y se centrifugaron a 14,500 rpm por 12 minutos. La extracción fenólica se repitió 2 veces, el sobrenadante (entre 250 y 300 µL) se transfirió a un cuarto tubo al que se le agregó el doble del volumen transferido de etanol absoluto (J. T. Baker) frío para precipitar el DNA. Después de centrifugar los tubos a máxima velocidad por 15 minutos el líquido se decantó cuidando no desprender la pastilla formada. Ésta se lavó con etanol al 70% (entre 300 y 500 µL) y posteriormente los tubos se centrifugaron a 14,500 rpm por 15 minutos. Este paso se repitió dos veces. La evaporación del residuo de etanol se llevo a cabo colocando los tubos boca abajo sobre papel absorbente y se mantuvieron así por 12 horas. Finalmente, el DNA se reconstituyó con 50 µL de buffer TE 1X (Tris-EDTA, pH 8.0) y para favorecer la máxima disolución del DNA los tubos se mantuvieron a 55 °C por 1 hora. Posteriormente los tubos se conservaron a 4 °C si el DNA se utilizaría dentro de las siguientes 24 horas o a -20 °C para un periodo de conservación mayor.

Para la observación del DNA se realizó un gel de agarosa al 1%, pesando 1 g de agarosa por cada 100 mL de buffer TBE 0.5X (Tris-Borato-EDTA; pH 8.0). El gel se tiñó con 1 µL de bromuro de etidio y la agarosa se decantó en una charola de electroforesis con sus peines respectivos.

Lo anterior se realizó en una campana de extracción y los peines se retiraron del gel una vez solidificado. La charola se introdujo dentro de una cámara para electroforesis saturada con buffer TBE 0.5X (Tris-Ácido Bórico-EDTA). Cada muestra de DNA (4 µL) se mezcló con 4 µL de buffer de carga. La mezcla se colocó en el pozo correspondiente. Por último se colocó 1 µL del marcador molecular, se colocó la tapa de la cámara de electroforesis, se colocaron los electrodos y éstos a su vez en la fuente de alimentación (Daigger 300). Las

muestras se corrieron bajo las siguientes condiciones: 30 minutos, 70 Voltios y 400 mili Amperes.

Para observar el DNA la charola se retiró de la cámara de electroforesis, se colocó en un transiluminador (White/2UV, UVP) para visualizar de manera rápida la posición del DNA y posteriormente la imagen se fotodocumentó y almacenó como una imagen.

La amplificación del DNA se llevo a cabo por medio de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (del inglés). Se llevo a cabo con iniciadores o cebadores (primers, del inglés) específicos para la región 16S de actinomicetos, lo que permite confirmar la identidad de los aislados de una manera rápida y confiable (ACF-254 [forward]: 5'-CGCGGCCTATCAGCTTGTTG-3' y ACR894 [reverse]: 5'-CCGTACTCCCCAGGCGGGG-3'; Stach *et al.*, 2003). En el primer paso se prepara la mezcla maestra (Master Mix, del inglés) de acuerdo las cantidades que se indican en la tabla 4. de Un tubo de PCR por cada muestra de DNA se amplificó además de realizar un tubo blanco (es decir sin DNA).

Tabla 4. Cantidades de reactivo necesarias para preparar la Master Mix.

Buffer	MgCl ₂	dNTPs	Primer ATC254	Primer ATC894	TaqPol	H ₂ O
5.0 µL	1.5 µL	1.25 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.2 µL	c.b.p. 50 µL/tubo

Las condiciones programadas del termociclador se indican a continuación:

35 ciclos Desnaturalización: 95°C por 1 minuto.
 Alineación: 55°C por 1 minuto.
 Extensión: 72°C por 1 minuto.

La amplificación y visualización de los productos de PCR se corroboró realizando una electroforesis horizontal como se indicó previamente.

3.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS CEPAS AISLADAS

- Curva de temperatura de cepas de *Staphylococcus epidermidis*

Debido a que *Staphylococcus epidermidis* se considera un patógeno oportunista y un microorganismo fastidioso, con el fin de evitar problemas en su crecimiento durante el desarrollo del experimento se realizó una curva de temperatura evaluando cinco diferentes temperaturas (4, 28, 30, 37 y 45 °C). Esta prueba se realizó en medio MH y se verificó dentro de estas temperaturas que la óptima para el desarrollo de los actinomicetos no sería un factor en contra para el crecimiento de los estafilococos y que por lo tanto, la posible inhibición observada se deba únicamente a la producción de algún metabolito por parte del actinomiceto.

- Evaluación antibacteriana por estría cruzada.

Se preparó medio Mueller-Hinton siguiendo las instrucciones del fabricante (Difco), y se vació en cajas Petri. Los actinomicetos se sembraron en un extremo de las placas, las cuales se incubaron por 10 días a 30 °C. Pasado este tiempo las cepas de prueba se inocularon en la placa en paralelo, a distancias iguales y en ángulo recto con respecto al crecimiento del actinomiceto. La actividad inhibitoria de cada actinomiceto contra las cepas de prueba se observó y registró a los 5, 10 y 15 días de crecimiento y se registró en milímetros de inhibición.

La actividad antimicrobiana se fotodocumentó fotografiando cada placa con una cámara digital (DSC-H7, Sony). Las placas se fotografiaron tanto por el anverso como por el reverso. Las fotografías se consideraron como un documento importante para la interpretación del tipo de inhibición observada.

Las cepas de prueba utilizadas fueron las siguientes:

Tabla 5. Cepas de prueba utilizadas para evaluar la actividad antimicrobiana

Bacteria	Cepa(s) de prueba
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>B. subtilis</i> ATCC 663309-09
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i> ATCC 25922-09-09
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 1388309-09
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 6538P09-09
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	23 aislados de infecciones oculares del Hospital "Conde de Valencia" con código: 51, 53, 98, 106,144, 159, 160, 1085, 1655, 1664-A, 1664-B, 1668, 1682, 1689, 1700, 1784-A, 1784-B, 1819, 1864, 2009, 2038, 2050 y 2938.

4) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS

La morfología de los aislados fue variada pero todos los aislados presentaron al menos una característica típica los actinomicetos, esto es: duros, secos, opacos, hundidos en el agar, algodonosos, esporulados o con pigmento difusible. Muchos de ellos presentaron además las características morfológicas coloniales de microorganismos del género *Streptomyces*, como presencia de micelio aéreo y esporas. El aislado EMMA-11-3 presentó un color café oscuro y el aislado EMMA-40-1 una esporulación muy abundante. Todas estas características pueden observarse en la figura 11.

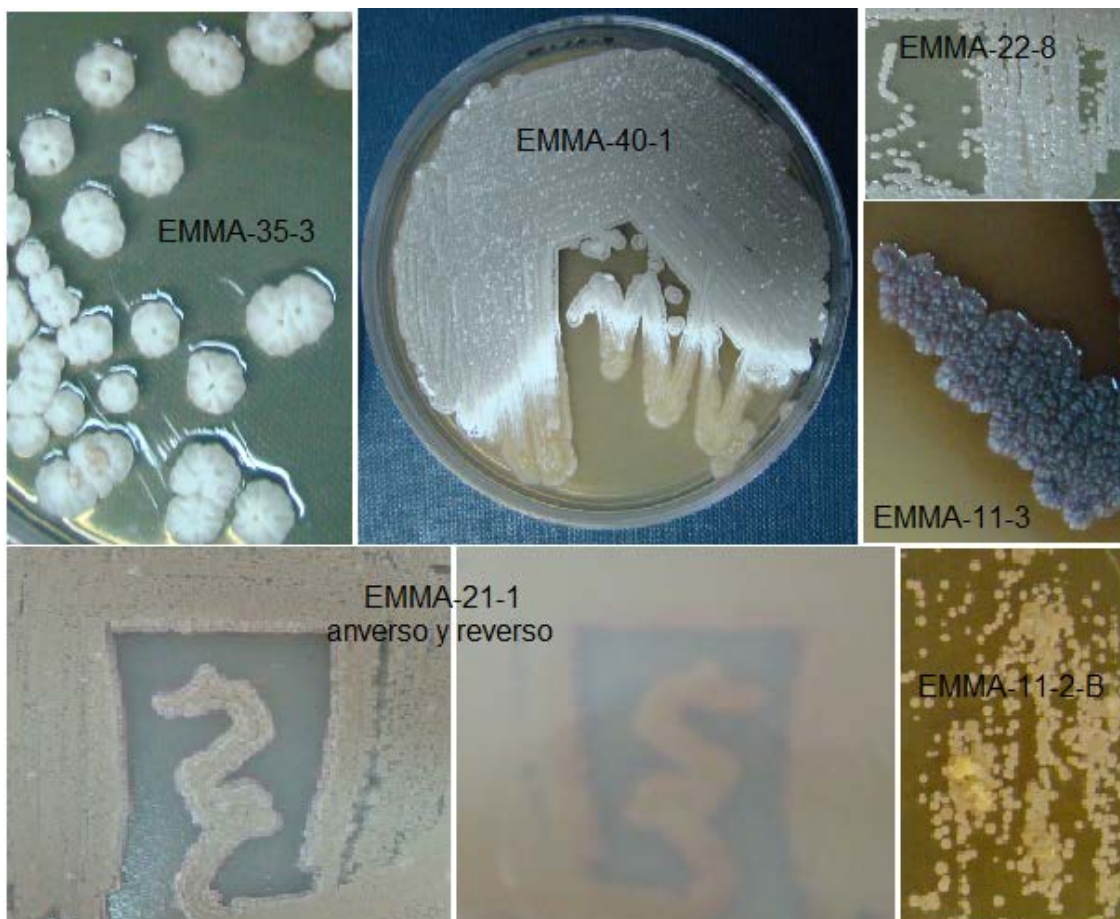


Figura 11. Características coloniales de algunos de los aislados.

Se corroboró por medio de la tinción de Gram que los aislados corresponden a bacterias filamentosas Gram positivas. Fue posible observar la presencia de hifas bajo el microscopio (objetivo 100X). Como ejemplo la siguiente figura.

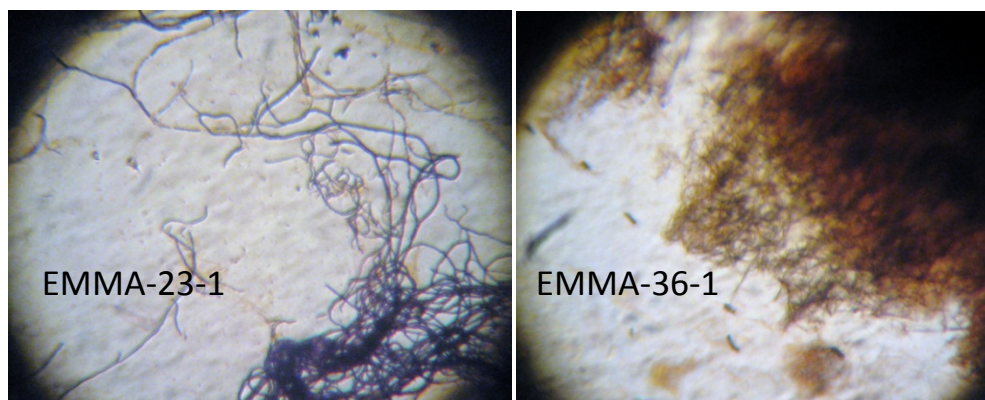


Figura 12. Observación microscópica (100X) de preparaciones de los aislados teñidas con la técnica de Gram.

Respecto a la determinación del isómero de DAP (Figura 13) 12 aislados (50%) presentan el isómero LL, 11 el isómero meso (45.8%) y 1 (4.2%) meso-hidroxi -meso-OH- (Tabla 6). La presencia del isómero LL en la pared de los 12 aislados indica que éstos organismos tienen la alta posibilidad de pertenecer al género *Streptomyces*. Para el resto de los aislados sería imposible indicar un género sin embargo se puede con seguridad indicar que pertenecen al selecto grupo de los actinomicetos raros. Eso es interesante porque 50% de los aislados pertenecen a los actinomicetos raros lo cual es un porcentaje importante dentro de una muestra relativamente pequeña de actinomicetos (24 aislados totales).

En la siguiente figura se muestra la placa de TLC con los hidrolizados obtenidos una vez revelada con Nihidrina. Los isómeros del DAP corresponden a los puntos cafés-grises más cercanos a la línea base que indica los códigos de cada aislado. Los puntos morados-rosados superiores corresponden a diversos aminoácidos.

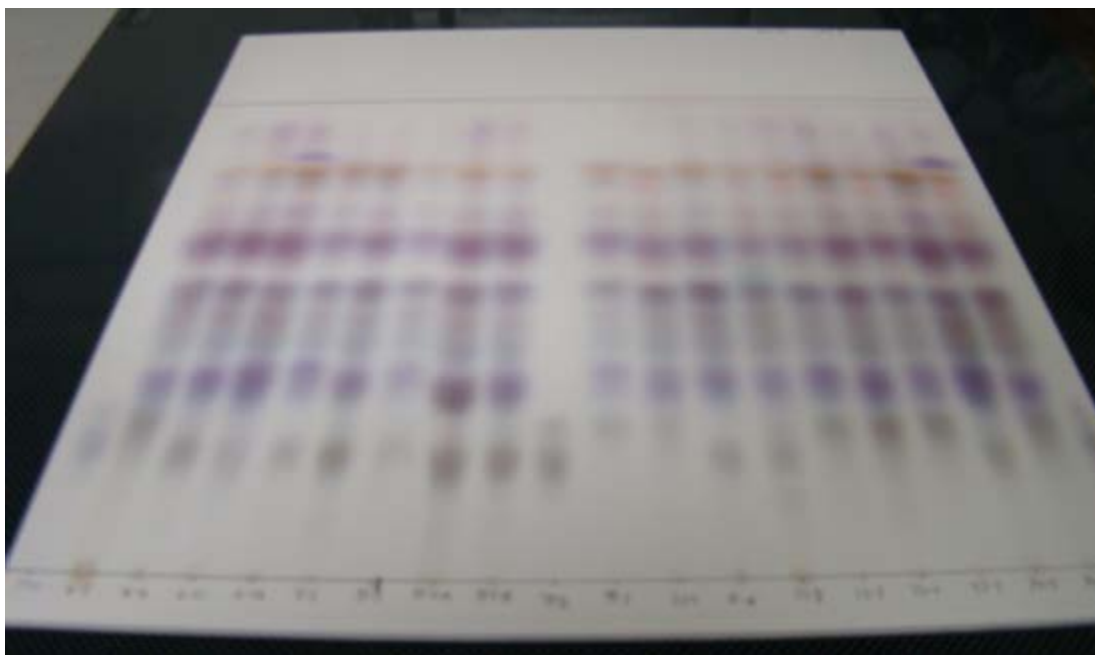


Figura 13. Placa de TLC que incluye el DAP de 17 aislados.

Nota: el orden de las muestras va de izquierda a derecha: estándar, 8 muestras, estándar, 9 muestras, estándar, empezando con EMMA-6-5 y terminando con EMMA-34-2.

Tabla 6. Identificación del isómero de DAP de los aislados.

Aislado	DAP	Aislado	DAP
1. EMMA-6-5	LL	13. EMMA-23-1	LL
2. EMMA-6-6	Meso	14. EMMA-23-2	LL
3. EMMA-6-11	Meso	15. EMMA-23-3	LL
4. EMMA-6-12	Meso	16. EMMA-34-1	Meso
5. EMMA-7-2	Meso	17. EMMA-34-2	LL
6. EMMA-11-1	Meso	18. EMMA-34-3	LL
7. EMMA-11-2-A	Meso	19. EMMA-34-4	LL
8. EMMA-11-2-B	Meso	20. EMMA-35-3	LL
9. EMMA-11-3	LL	21. EMMA-36-1	LL
10. EMMA-21-1	LL	22. EMMA-40-1	LL
11. EMMA-21-6	Meso	23. EMMA-40-1*	Meso
12. EMMA-22-8	Meso-OH	24. EMMA-40-2	Meso

Respecto a la caracterización molecular una vez que se corroboró la extracción del material genético mediante una electroforesis (Figura 13) se realizó la PCR con los iniciadores específicos (Act 254 y Act 894) donde posteriormente se corroboró la presencia de una banda específica de 690 pares de bases (bp) correspondiente a la clase *Actinobacteria* para todos los aislados, como se ilustra con algunos de los aislados en la Figura 14.

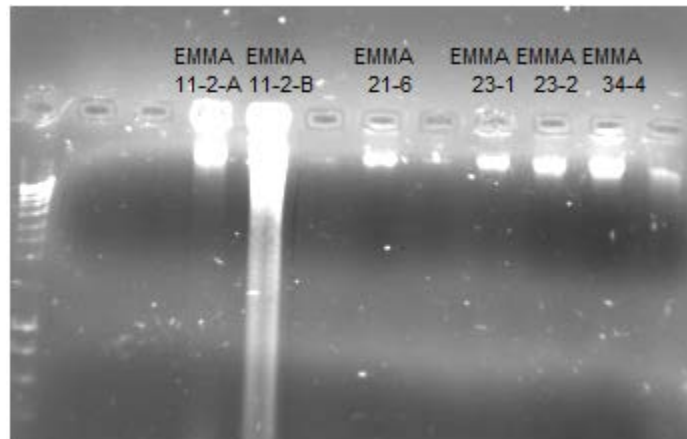


Figura 13. Observación de DNA de algunos de los aislados mediante electroforesis horizontal.

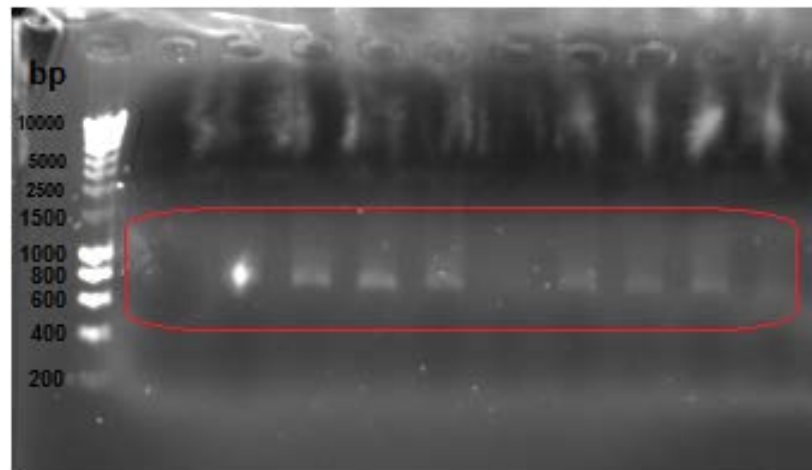


Figura 14. Observación del producto de la PCR para los aislados con cebadores específicos para la clase *Actinobacteria*.

Nota: De izquierda a derecha los aislados son: EMMA-22-8, EMMA-23-1, EMMA-23-3, EMMA -34-1, EMMA-34-2, EMMA-34-3, EMMA-35-3, EMMA-36-1, EMMA-40-1 y EMMA-40-2.

4.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los aislados se seleccionó el 50% de los éstos, 6 con isomero LL y 6 con isomero meso del DAP. Los aislados seleccionados fueron: EMMA-7-2, EMMA-11-1, EMMA-11-2-A, EMMA-11-2-B, EMMA-11-3, EMMA-21-1, EMMA-21-6, EMMA-23-2, EMMA-34-2, EMMA-34-4, EMMA-35-3 y EMMA-40-2. La selección se hizo en función de que inicialmente se tenía la idea que los *Streptomyces* (microorganismos con DAP LL) eran los microorganismos más prolíficos de los actinomicetos en producir compuestos bioactivos, sin embargo, en las últimas dos décadas se ha observado y descubierto que miembros de los actinomicetos raros (microorganismos con DAP meso) producen importantes compuestos bioactivos.

Las cepas de prueba corresponden a microorganismos oportunistas generalmente de pacientes inmunocomprometidos o debilitados, lo que quiere decir que constantemente son el blanco de las terapias antibióticas. Las cepas patógenas de bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* o *S. epidermidis* causan algunas de las enfermedades infecciosas más recurrentes en la clínica debido a la rapidez con la que generan resistencia a las terapias con antibióticos tradicionales, esta rápida generación de resistencia que muchas veces es cruzada (entre familias enteras de antibióticos) entre cepas se debe a la transferencia de información genética por el uso de plásmidos que actúen como vector de resistencia, de ahí la importancia de usarlas en estos estudios.

Primero se eligieron dos bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*) y dos bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*). Posteriormente se utilizaron 23 cepas de *Staphylococcus epidermidis* porque en años recientes ha sido considerado como patógeno oportunista y se le ha aislado en hospitales a partir de pacientes con infecciones oculares.

4.2.1 EVALUACIÓN DE DIFERENTES TEMPERATURAS PARA EL CRECIMIENTO DE CEPAS DE *S. epidermidis*

El crecimiento de las cepas de *S. epidermidis* se evaluó en cinco diferentes temperaturas, utilizando una escala numérica que indica desde un desarrollo nulo (valor de cero) hasta un desarrollo muy abundante (valor de cinco).

En la siguiente figura se puede observar que a 30 grados centígrados las cepas de *S. epidermidis* no se ven afectadas respecto a su crecimiento.

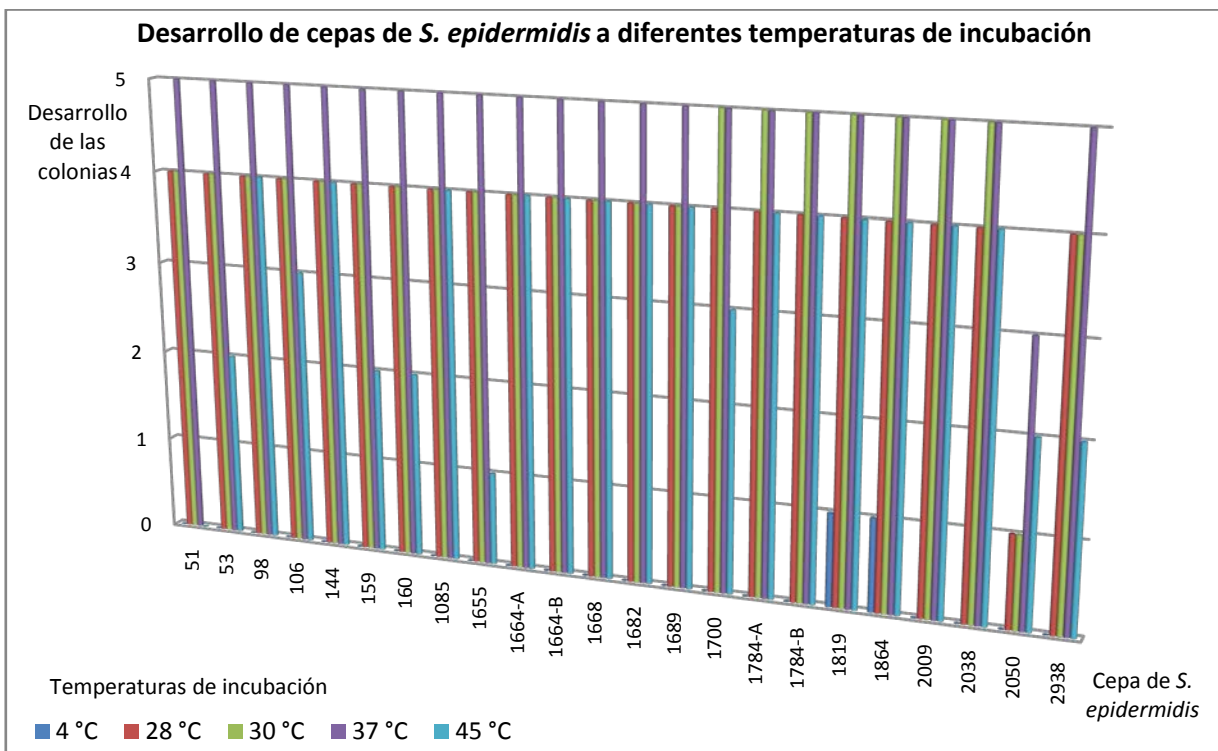


Figura 15. Intervalo de crecimiento a diferentes temperaturas para las cepas de *S. epidermidis* probadas.

Esta evaluación resulta de especial importancia para controlar algunos factores que aparentemente podrían afectar la actividad antimicrobiana de un microorganismo prueba, lo cual no fue el caso en este experimento.

4.2.2 EVALUACIÓN *in vitro* DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Para la determinación de la actividad antibacteriana se estableció una escala de cuatro niveles: 1) Nula: de 0 a 1 mm, 2) Baja: de 2 a 4 mm, 3) Media: de 5 a 9 mm y 4) Alta: mayor a 10 mm que se utilizó durante los tres periodos de incubación aplicados. Como se observa en las siguientes páginas el análisis se realizó de manera individual y en un orden cronológico. Esto corresponde a que la inhibición observada para cada aislado fue única.

➤ Aislado EMMA-7-2

En las figuras 16a y 16b podemos observar que el aislado EMMA-7-2 presenta actividad antibacteriana desde los cinco días de incubación.

La actividad de este aislado es baja o media y se observa que no hay cambios significativos en los siguientes dos periodos de incubación evaluados, lo que sugiere que la actividad es sostenida a medida que el metabolito se disuelve en el medio.

Además esta actividad tiene un amplio espectro (inhibe tanto Gram positivas como negativas). La mayor actividad se observó para cepas de *S. epidermidis* y la menor contra *E. coli* donde es nula. Interesantemente, tiene actividad contra bacterias que esporulan (*B. subtilis*) y que forman cápsula (*K. pneumoniae*). Esto es importante desde el punto de vista clínico, porque bacterias con estas características presentan resistencia a algunos antibióticos comerciales.

El aislado EMMA-7-2 corresponde al grupo de los actinomicetos raros ya que tiene la forma meso del DAP. Esta característica y el amplio intervalo de inhibición que presenta lo hace un candidato ideal para estudios posteriores de identificación microbiana a nivel molecular y de análisis respecto al metabolito secundario con actividad biológica que está produciendo, al menos en la estrategia experimental aquí probada con medio sólido.

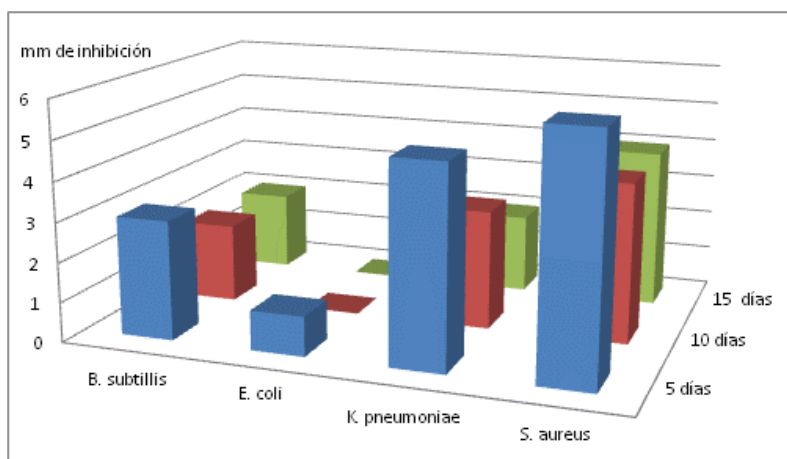


Figura 16a. Actividad antibacteriana de EMMA-7-2 contra cepas de referencia.

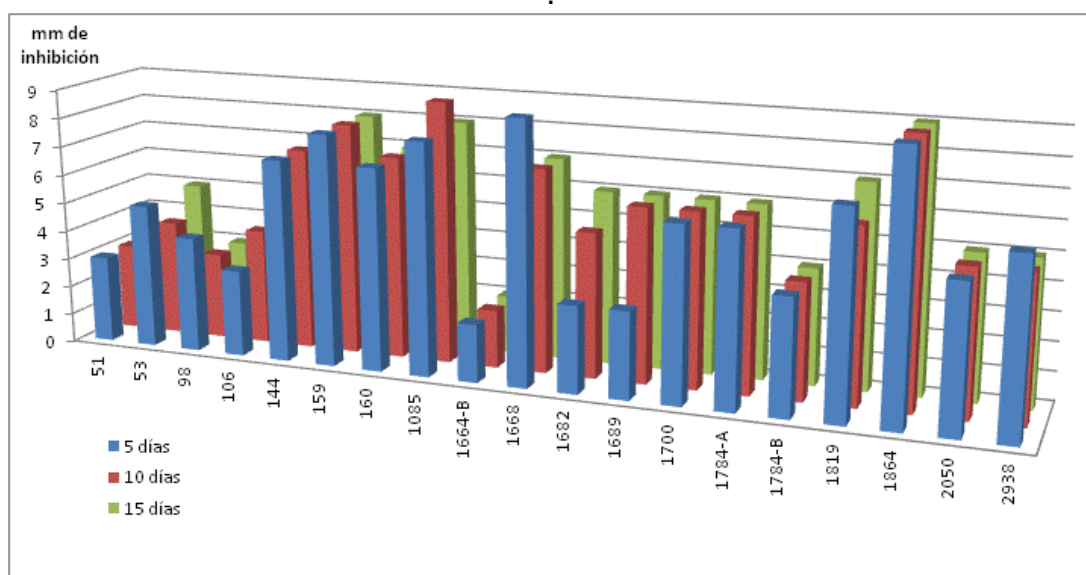


Figura 16b. Actividad antibacteriana de EMMA-7-2 contra cepas de *S. epidermidis*.

➤ Aislado EMMA-11-1

En la figura 17b se puede observar que el aislado EMMA-11-1 presenta una actividad antibacteriana heterogénea (nula, baja, media y alta).

El aislado no presenta actividad antimicrobiana contra las cepas de prueba. Por otro lado este aislado tiene un nivel alto de inhibición contra tres cepas de *S. epidermidis* (1664-B, 1668 y 1864) pero en general se podría decir que tiene un nivel medio respecto a las cepas de *S. epidermidis* probadas.

Este aislado también corresponde al grupo de los actinomicetos raros (meso DAP) pero no está claro si sería un candidato potencial para estudios posteriores de identificación y metabolitos secundarios producidos, antes sería recomendable hacer mas estudios de este tipo para observar la reproducibilidad.

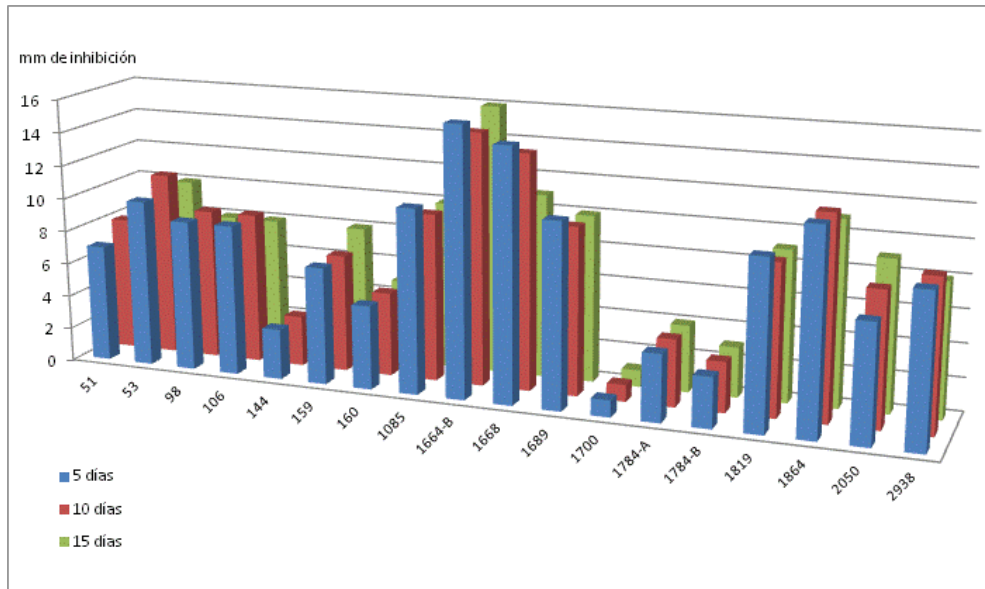


Figura 17b. Actividad antibacteriana de EMMA-11-1 contra cepas de *S. epidermidis*.

➤ Aislado EMMA-11-2-A

El aislado EMMA-11-2-A (Figuras 18a y 18b) presenta actividad contra bacterias Gram positivas pero no para Gram negativas. De los tres aislados analizados hasta el momento este el único con esta característica. En general la actividad se puede considerar alta ya que es mayor a 10 mm contra 16 de los 23 aislados analizados de *S. epidermidis* y esto corresponde al 70% de ellos. Es interesante que los mayores valores se presenten particularmente contra *S. epidermidis*. Éste organismo tiene la característica de producir biopelícula. Ésta puede ser utilizada como un mecanismo de resistencia a los antibióticos comerciales actuales. En general se puede observar en las figuras que la actividad se mantiene constante para los 10 y 15 días de evaluación.

Este organismo corresponde también a un actinomiceto raro, siendo un buen candidato para análisis de identificación así como para los metabolitos secundarios que pudiera estar produciendo.

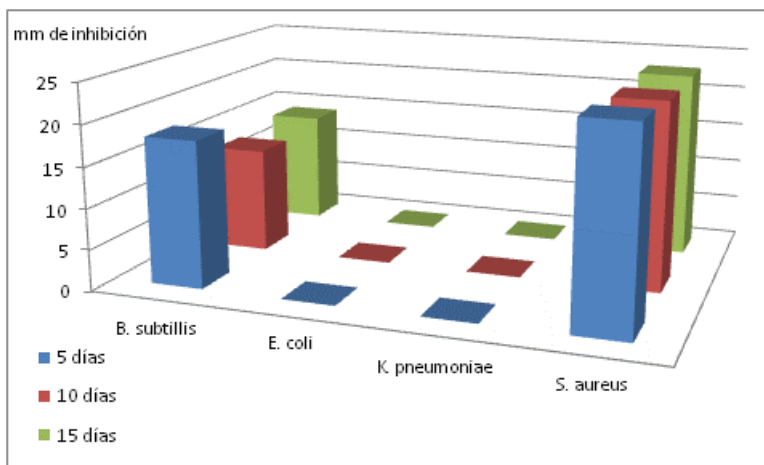


Figura 18a. Actividad antibacteriana de EMMA-11-2-A contra cepas de referencia.

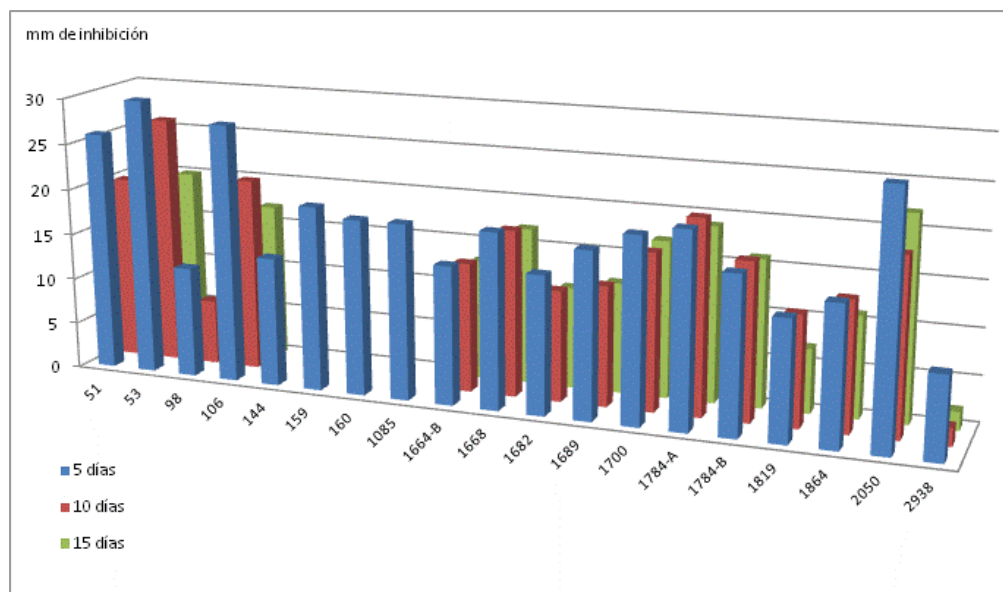


Figura 18b. Actividad antibacteriana de EMMA-11-2-A contra cepas de *S. epidermidis*.

➤ Aislado EMMA-11-2-B

El aislado EMMA-11-2-B (Figuras 19a y 19b) presenta una actividad antimicrobiana heterogénea (nula, baja, media o alta). Tiene actividad contra

bacterias Gram positivas al igual que el aislado anterior, pero a diferencia de este en general su actividad es baja. Un dato interesante de este aislado es que presenta características coloniales similares a aquellas del aislado EMMA-11-2-A. Esto podría indicar que se trataba del mismo aislado o morfotipo, pero es claro cuando se comparan los resultados de ambas actividades que no son el mismo organismo. Esto lo coloca como un buen candidato para análisis de identificación molecular, no así para análisis de la producción de metabolitos secundarios, respecto a otros de los aislados analizados.

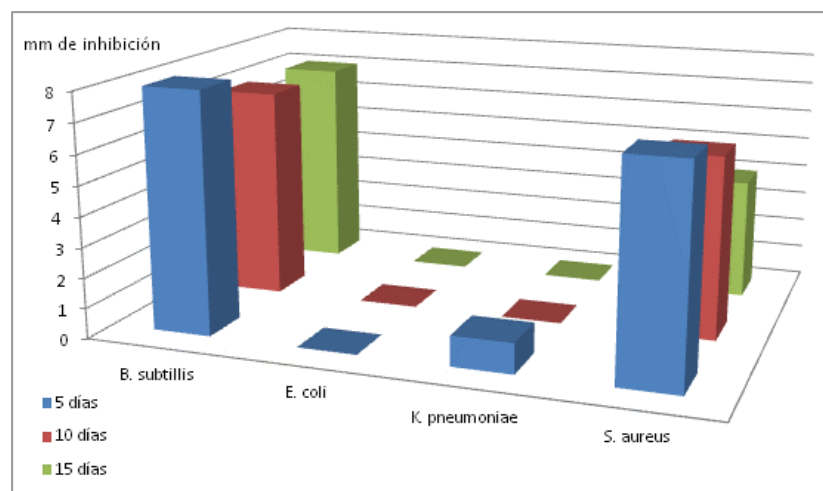


Figura 19a. Actividad antibacteriana de EMMA-11-2-B contra cepas de referencia.

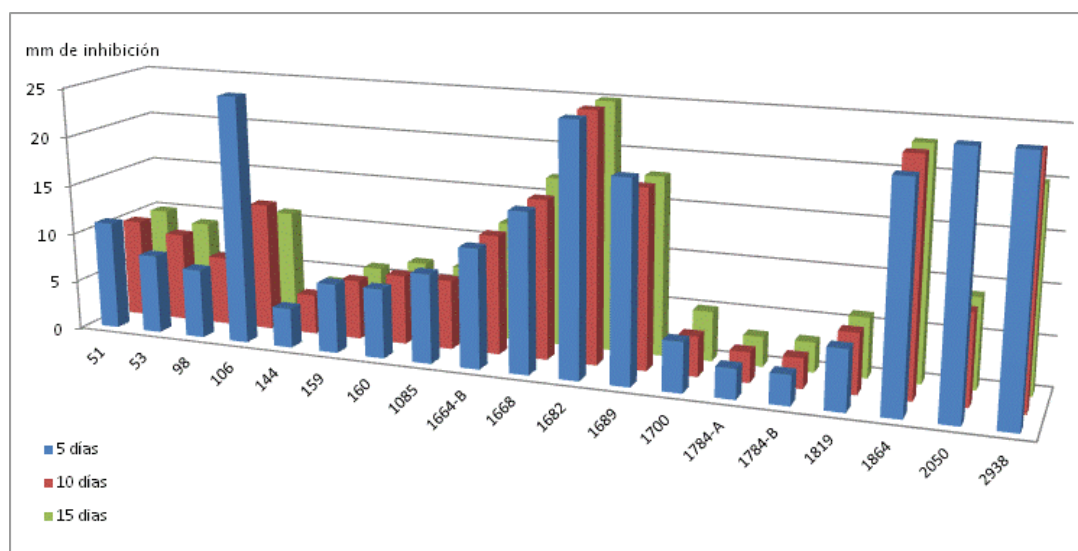


Figura 19b. Actividad antibacteriana de EMMA-11-2-B contra cepas de *S. epidermidis*.

➤ Aislado EMMA-11-3

El aislado EMMA-11-3 tiene una actividad de nula a baja. Esta actividad es equivalente contra bacterias Gram positivas y negativas y por ello no se ilustra.

Respecto a las cepas de *S. epidermidis* su actividad es heterogénea (nula, baja media y alta) y no hay un cambio significativo para los tres periodos de incubación evaluados. Es interesante observar que el tipo de isomero de DAP corresponde a LL, probablemente un miembro del género *Streptomyces*, (productores prolíficos de metabolitos secundarios activos) pero por el momento no sería un candidato para estudios de identificación molecular ni para evaluación de producción de metabolitos secundarios.

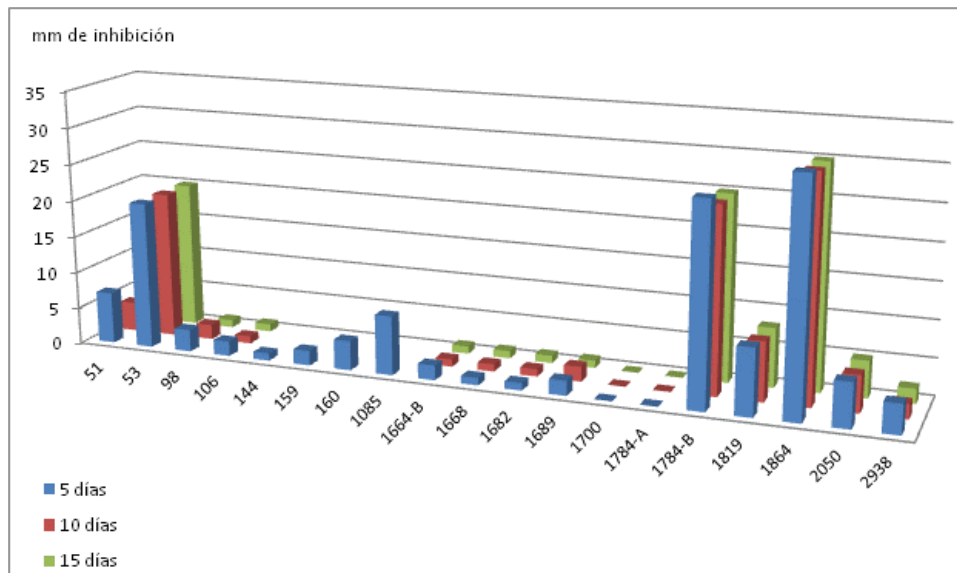


Figura 20b. Actividad antibacteriana de EMMA-11-3 contra cepas de *S. epidermidis*.

➤ Aislado EMMA-21-1

El panorama del aislado EMMA-21-1 es muy similar al último analizado. Actividad heterogénea y en general baja tanto para bacterias Gram positivas como negativas. No hay un cambio significativo para los tres periodos de incubación evaluados. Aunque interesantemente presenta isomero LL, por el momento no

sería un candidato para estudios de identificación molecular ni para evaluación de producción de metabolitos secundarios.

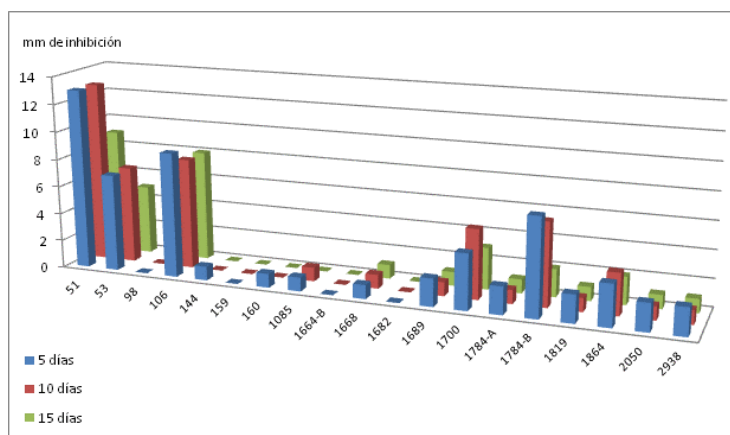


Figura 21b. Actividad antibacteriana de EMMA-21-1 contra cepas de *S. epidermidis*.

➤ Aislado EMMA-21-6

El aislado EMMA-21-6 tampoco tiene actividad contra bacterias Gram positivas y negativas. Respecto a *S. epidermidis* en la siguiente figura podemos observar que aunque el 90% de las cepas se ven inhibidas como ya se mencionó la actividad es baja y heterogénea también para estos organismos. Interesantemente presenta DAP *meso* pero no sería un candidato para estudios posteriores de identificación molecular y análisis de los metabolitos que produce.

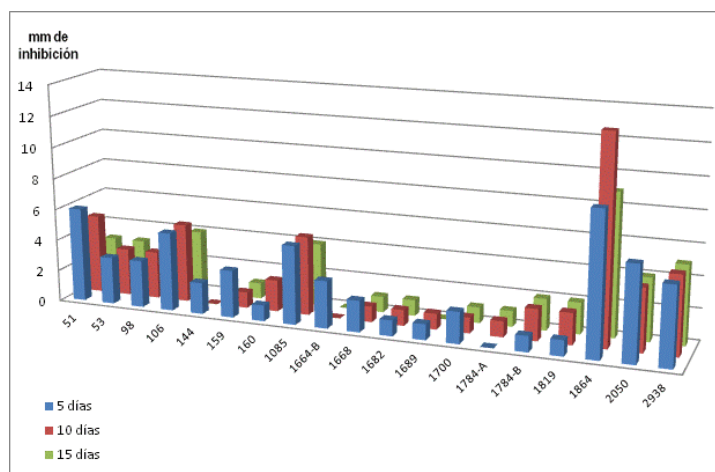


Figura 22b. Actividad antibacteriana de EMMA-21-6 contra cepas de *S. epidermidis*.

➤ Aislado EMMA-23-2

El aislado EMMA-23-2 presenta una actividad nula, baja o alta. Su actividad es nula para las cepas de referencia (*K. pneumoniae*, *S. aureus*, *B. subtilis* y *E. coli*) y baja para *S. epidermidis* 98, 106, 2050 y 2938 como se observa en la siguiente figura. A pesar de esto y a que tiene altos valores de inhibición contra otras cepas de *S. epidermidis* sería recomendable hacer más estudios con este microorganismo, ya sea con las mismas cepas para obtener reproducibilidad en estas observaciones, o con otras cepas para delimitar con mayor detalle el espectro de acción que tiene, además de realizar su identificación molecular y análisis de los metabolitos secundarios que produce. Este es el primer aislado con DAP LL en presentar una alta actividad antimicrobiana.

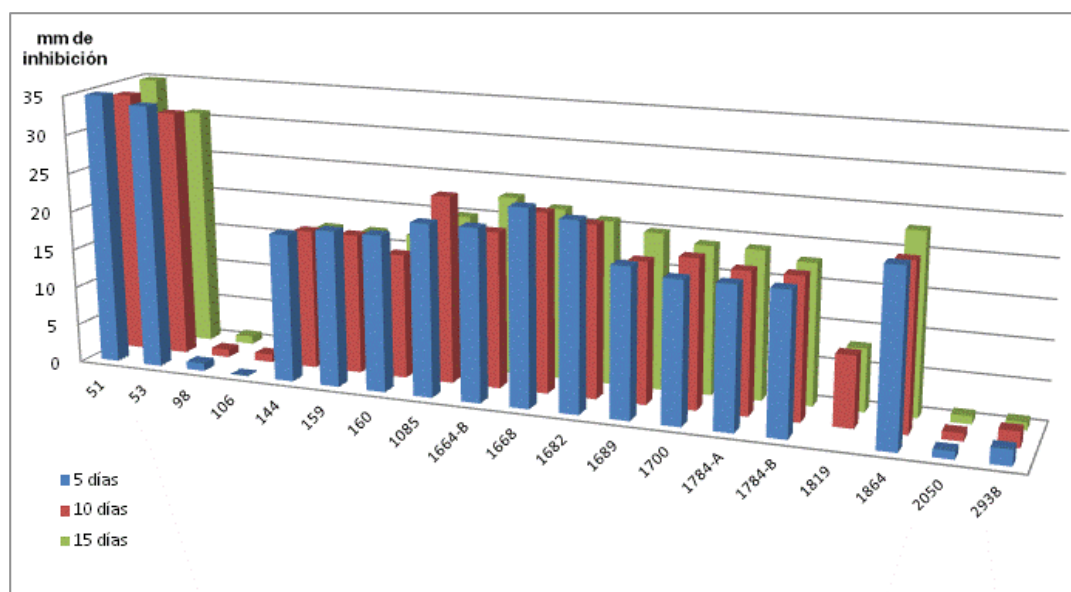


Figura 23b. Actividad antibacteriana de EMMA-23-2 contra cepas de *S. epidermidis*.

➤ Aislado EMMA-34-2

El asilado EMMA-34-2 presenta una actividad heterogénea, siendo nula para las cepas de referencia; baja para *S. epidermidis* 1700, 1784-A y 1784-B,

media para la mayoría de las cepas de *S. epidermidis* y alta solo con *S. epidermidis* 1819. En general no hay cambios significativos para los tres periodos de incubación evaluados a excepción de *S. epidermidis* 1819. Pese a esto y a que presenta isomero LL, no puede ser un candidato para estudios de identificación molecular ni para evaluación de producción de metabolitos secundarios por ahora pero sería recomendable hacer más estudios con las mismas cepas para observar la reproducibilidad de estas observaciones.

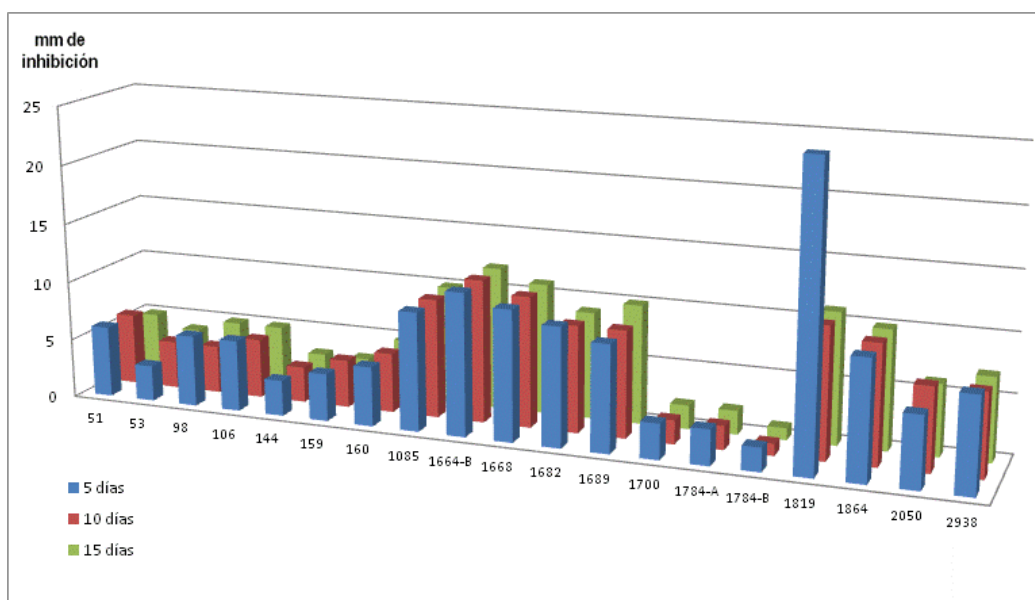


Figura 24b. Actividad antibacteriana de EMMA-34-2 contra cepas de *S. epidermidis*.

➤ Aislado EMMA-34-4

En la siguiente figura se observa que el aislado EMMA-34-4 presenta un comportamiento similar al aislado EMMA-23-2. La actividad es nula, baja o alta. Baja para *E. coli* por parte de las cepas de referencia. Con respecto a las cepas de *S. epidermidis* en general tiene alta actividad, excepto para la cepa 106. Si bien esta actividad inhibitoria disminuye ligeramente a medida que pasa el tiempo de incubación (10 y 15 días) a los 5 días tiene una alta inhibición.

Resulta interesante que dentro de las cepas de referencia se vea inhibida únicamente *E. coli* por lo que probablemente el espectro de acción del metabolito

que se está produciendo sea muy específico y no actué a nivel de la pared bacteriana puesto que el gram no parece ser determinante como se observa con las cepas de *S. epidemidis*.

Este sería el segundo candidato con DAP LL para hacer estudios posteriores de identificación molecular y análisis de metabolitos secundarios.

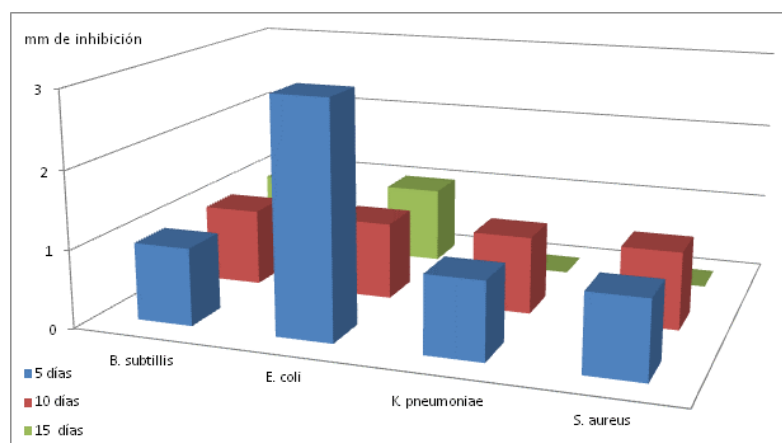


Figura 25a. Actividad antibacteriana de EMMA-34-4 contra cepas de referencia.

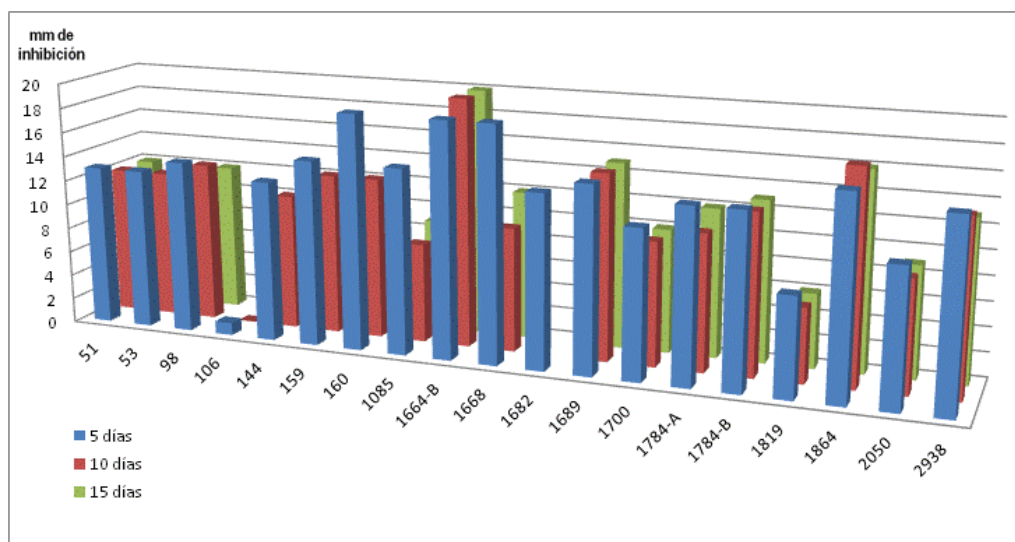


Figura 25b. Actividad antibacteriana de EMMA-34-4 contra cepas de *S. epidemidis*.

➤ Aislado EMMA-35-3

El aislado EMMA-35-3 (siguientes figuras) presentó una alta inhibición contra *B. subtilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. aureus* (amplio espectro de acción);

en contraste presenta baja actividad contra varias cepas de *S. epidermidis*. Se puede observar en la siguiente figura que los valores de la alta actividad se mantienen constantes en los tres periodos de tiempo evaluados.

Esta característica no se había presentado en ninguno de los aislados anteriormente analizados lo que se considera suficiente para que se realice la completa identificación de este organismo, además de que tiene DAP LL.

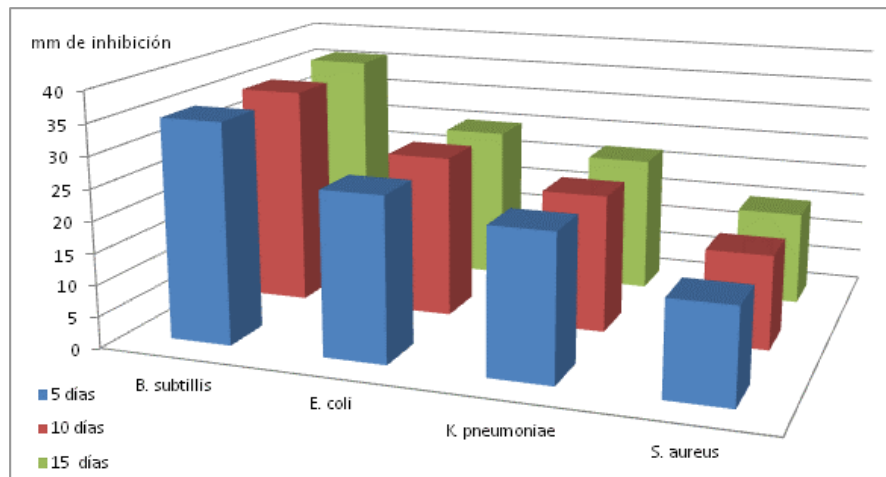


Figura 26a. Actividad antibacteriana de EMMA-35-3 contra cepas de referencia.

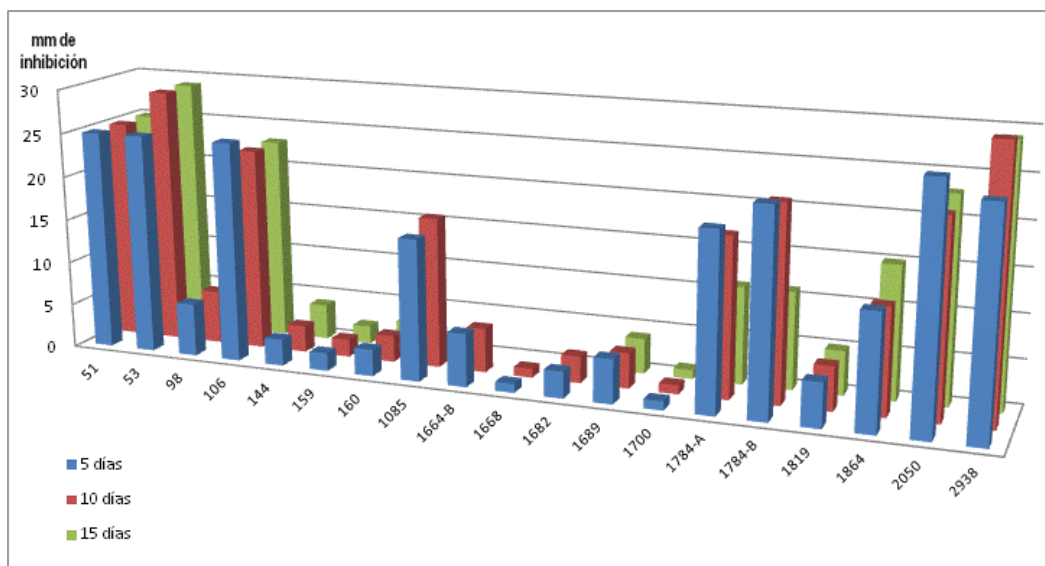


Figura 26b. Actividad antibacteriana de EMMA-35-3 contra cepas de *S. epidermidis*.

➤ Aislado EMMA-40-2

En la siguiente figura se puede observar que la actividad del último aislado analizado en contraste con el microorganismo anterior, prácticamente no se presenta, tiene actividad nula contra las cepas de referencia y baja con respecto a las cepas de *S. epidermidis* excepto para 2938. Comparado con sus similares respecto al DAP, éste sería el organismo con los menores valores de inhibición por lo que no sería un candidato potencial para estudios posteriores inmediatos.

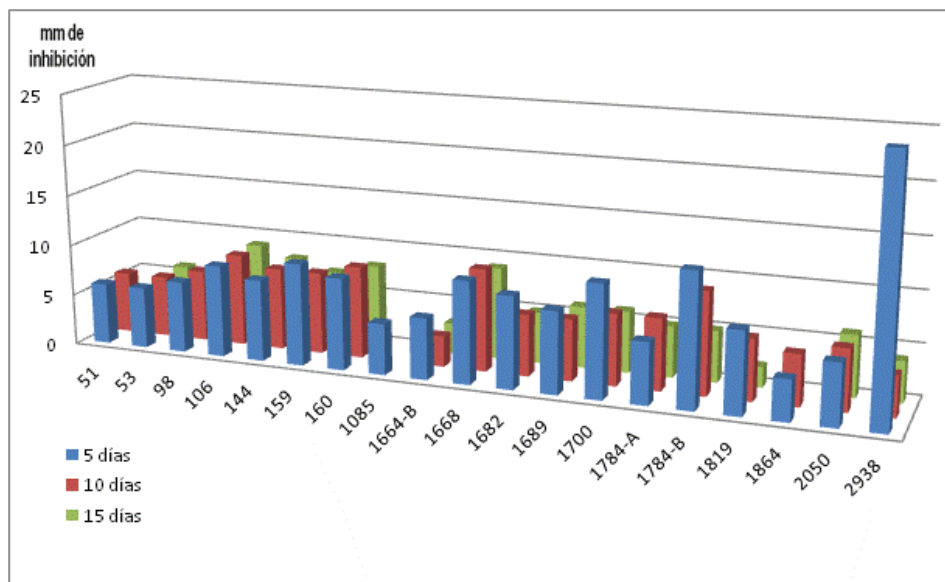


Figura 27b. Actividad antibacteriana de EMMA-40-2 contra cepas de *S. epidermidis*.

Como un análisis general de la actividad antimicrobiana de los aislados del presente proyecto, seis de ellos (50%) presentan una actividad antimicrobiana prometedora que los posiciona como candidatos potenciales de estudios futuros inmediatos, principalmente para su identificación molecular. Los códigos de estos organismos son: EMMA-7-2, EMMA-11-2-A, EMMA-11-2-B, EMMA-23-2, EMMA-34-4 y EMMA-35-3.

Estos aislados son diversos ya que presentan diferente tipo de DAP. Cuando se comparan los resultados de aquellos con DAP LL se observa que el perfil de inhibición es diferente, lo mismo pasa con aquellos con DAP meso. Además, con base en el DAP tenemos un 50% de aislados prometedores LL y la otra mitad con meso. Por lo tanto, esta característica parece ser indistinta para observar la inhibición, el espectro de ésta y su potencia.

El espectro de los aislados es contra bacterias Gram positivas como negativas, para bacterias que esporulan, producen cápsula o biopelícula. Por lo tanto se puede especular que los metabolitos producidos por los aislados son altamente diversos.

Con base en la duración del efecto inhibitorio este es variable y se presenta en general en los primeros 5 días de prueba. Cuando su evaluación se realizó a los 10 y 15 días, “groso modo” no se ve una diferencia significativa.

Se puede observar además, que existen aislados con una inhibición muy específica. Algunos de ellos para bacterias ya sea Gram positivas o negativas, pero dentro de las bacterias Gram positivas, tanto para *B. subtilis* como para *S. epidermidis*.

5) CONCLUSIONES

La caracterización molecular permitió establecer que todos los aislados pertenecen a la clase *Actinobacteria*. También, que es necesario una identificación más fina para establecer el género y/o especie de los mismos.

La evaluación de la actividad antimicrobiana, indica que existen seis candidatos potenciales para el análisis del tipo específico de metabolitos secundarios que están produciendo debido a su inhibición sobre las bacterias probadas.

50% de los aislados pertenecen probablemente al género *Streptomyces* (DAP LL) y el otro 50% al selecto grupo de actinomicetos raros (DAP meso).

Existe una inhibición muy específica para cierto tipo de organismos, ya sea Gram positivos como negativos, por los aislados evaluados.

Al menos uno, de los 12 aislados evaluados presentó actividad antimicrobiana para cada una de las cepas de prueba. Las cuales incluyeron bacterias Gram positivas o negativas, esporuladas, formadoras de cápsula o biopelícula.

6) PERSPECTIVAS

El presente proyecto, apoya la idea de la importancia que tiene estudiar a los microorganismos con un enfoque de novedad y explotación microbiana. La actividad antibacteriana observada de parte de los aislados frente a cepas de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, permite proponer que se requieren más estudios que permitan aprovechar de una mejor manera los recursos microbianos nacionales.

Sería interesante evaluar si los aislados estudiados presentan otro tipo de actividad, como por ejemplo antifúngica. *Candida albicans*, como patógeno oportunista podría ser el primero en evaluarse.

También se podría evaluar su actividad antineoplásica, contra diversas líneas celulares cancerígenas, por mencionar un par de ejemplos de actividades que se les atribuyen a cepas de actinomicetos.

La identificación molecular de al menos seis de los aislados evaluados, es necesaria, para saber con certeza con qué tipo de actinobacteria se está trabajando.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arenas, R. 2008. *Micología Médica Ilustrada*. Mc Graw Hill interamericana, 3ª Edición: 9-14
2. Avedaño, C. 2001. *Introducción a la química Farmacéutica*. Mc Graw Hyll Interamericana, 2ª Edición: 28-41
3. Bhatnagar, I. & Kim, S. K. 2010. *Immense Essence of Excellence: Marine Microbial Bioactive Compounds*. *Marine Drugs*, 8: 2673-2701
4. Bhatnagar, I. & Kim, S. K. 2010. *Marine Antitumor Drugs: Status, Shortfalls and Strategies*. *Marine Drugs*, 8: 2702-2720
5. Blanco, B. S., García, M. C. & Sanz, S. L. 2010. *Los actinomicetos como fuente de productos de interés biotecnológico*. Internet: <http://blogs.creamoselfuturo.com/bio-tecnologia/2010/06/18/los-actinomicetos-como-fuente-de-productos-de-interes-biotecnologico/>
6. Bonifaz, A. 2008. *Micología médica básica*. Mc Graw Hyll Interamericana 3ra. Ed: 31-35
7. Boucher, Y., Douady, C.J., Papke, R.T., Walsh, D.A., Boudreau, M.E., Nesbo, C.L., Case, R.J. & Doolittle, W.F. 2003. *Lateral gene transfer and the origins of prokaryotic groups*. *Annual Review of Genetics*, 37: 283-328
8. Brooks, G. F., Carroll, C. K., Butel, S. J. & Morse, S. A. 2008. *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. Manual Moderno, 19ª edición: 515-519, 527-534, 1147-1149, 1163, 1167-1169.
9. Castellano, G. M., Perozo, M. A., Vivas, V. R., Ginestre, P. M. & Rincón, V. G. 2009. *Tipificación molecular y fenotípica de Staphylococcus aureus resistentes a meticilina (SAMR) en un hospital universitario*. *Revista Chilena de Infectología*, 26 : 39-48
10. Cifuentes, L. J., Torres, G. P. & Frías, M. M. 1991. *El océano y sus recursos*. Internet: http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/100/html/sec_11.html

11. Cole, S. T., Eisenach K. D., McMurray D. N. & Jacobs W. R. (Eds) 2004. *Tuberculosis and the tubercle bacilli*. The American Society of Microbiology. 18-23
12. Contreras, L. 2011. *Visión actual del metabolismo secundario en Streptomyces*. Trabajo monográfico de actualización, QFB, Facultad de Química, UNAM. 1-29
13. Euzéby, J. P. 2012. *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus Streptomyces*. Internet: <http://www.bacterio.cict.fr/s/streptomycesa.html>
14. Fogarty, W.M. & Kelly, C.T. 1990. *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Elsevier science publishers, 2nd Edition: 38-44, 204-215
15. Global Biodiversity Outlook. 2010. *Perspectiva mundial sobre la biodiversidad*. Internet: <http://www.cbd.int/doc/publications/gbo/gbo-summes.pdf?lg=1>
16. Gontang, A. E., Gaudêncio, P. S., Fenical, W. & Jensen, R. P. 2010. *Sequence-Based Analysis of Secondary-Metabolite Biosynthesis in Marine Actinobacteria*. Applied and Environmental Microbiology, 76 : 2487–2499
17. Goodfellow, M. & O'Donnell, A. G. 1993. (eds). *Handbook of new bacterial systematics*. Academic Press Limited. 195-250
18. Gulder, T. & Moore, B. 2010. *Salinosporamide Natural Products: Potent 20S Proteasome Inhibitors as Promising Cancer Chemotherapeutics*. Angewandte Chemie International Edition, 49 : 9346–9367
19. Izumi, H., Gauthier, M. E. A., Degnan, B. M., Kai Ng, Y., Hewavitharana, A. K., Shaw, P. N. & Fuerst, J. A. 2010. *Diversity of Mycobacterium species from marine sponges and their sensitivity to antagonism by sponge-derived rifamycin synthesizing actinobacterium in the genus Salinispora*. FEMS Microbiology Letters, 313 : 33–40
20. Lam, K. S. 2006. *Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes*. Current Opinion in Microbiology, 9: 245-251

21. Lazzarini, A., Cavaletti L., Toppo G. & Marinelli F. 2000. Rare *genera of actinomycetes as potential producers of antibiotics*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78: 399-405
22. Lechevalier, M. & Lechevalier, H. 1970. *Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 20: 435-443
23. Logan, N. 1994. *Bacterial systematics*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 21-26
24. Lombó, F., Braña, F. A., Méndez, C. & Salas, A. J. 1999. *The Mithramycin Gene Cluster of Streptomyces argillaceus Contains a Positive Regulatory Gene and Two Repeated DNA Sequences That Are Located at Both Ends of the Cluster*. *Journal of Bacteriology*, 181 : 642–647
25. Lombó, F., Abdelfattah, S. M., Braña, F. A., Salasa A. J., Rohr, J. & Méndez, C. 2009. *Elucidation of Oxygenation Steps during Oviedomycin Biosynthesis and Generation of Derivatives with Increased Antitumor Activity*. *Chembiochem*, 10 : 296–303
26. 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
27. 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
28. Maldonado, L. A., Stach J. E. M., Pathom-aree W., Ward A. L., Bull A. T. & Goodfellow M. 2005b. *Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87 : 11-18
29. Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. 2004. Brock. *Biología de los microorganismos*. Pearson Education 10 ed. Madrid : 19, 23, 26-30, 74-77, 107-109, 150-162, 253-260, 300, 302-305, 307-308, 3121- 314, 318-326, 386-393

30. Marín, G. R. 2003. *Fisicoquímica y microbiología de los medios acuáticos* Editorial Díaz de Santos, Madrid: 5-7, 23-25, 111, 223-233
31. McMurry, J. 1995. *Organic Chemistry*. 4th Edition, Brooks/Cole Publishing Company: 295-312
32. Mikán, J.F. & Castellanos, D.E. 2004. *Screening para el aislamiento y caracterización de microorganismos y enzimas potencialmente útiles para la degradación de celulosas y hemicelulosas*. Revista colombiana de biotecnología, 6 : 58-71
33. Mincer, J. T., Jensen, R. P., Kauffman, A. C. & Fenical, W. 2002. *Widespread and Persistent Populations of a Major New Marine Actinomycete Taxon in Ocean Sediments*. Applied and Environmental Microbiology, 68 : 5005–5011
34. Miyado, S., Tsuchizaki, N., Ishikawa, J., & Hotta, K. 2002. Digital Atlas of Actinomycetes. Internet: <http://www.nih.go.jp/sai/Atlas/>
35. Murray, R. P., Baron, J. E., Jorgensen, H. J., Landry, M. L. & Pfaller, A. M. 2007. *Manual of clinical microbiology Vol.1*. The American Society of Microbiology Press, USA, 9th Edition : 485-542, 1223-1242
36. Neuhaus, F.C. & Baddiley, J. 2003. *A continuum of anionic charge: structures and functions D-alanyl-teichoic acids in gram positive bacteria*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67 : 686-723
37. Peláez, F. & Genilloud O. 2004. *Nuevos fármacos basados en productos naturales de origen microbiano*. Centro de Investigación Básica Merck, Sharp & Dohme de España, S.A. : 123-166
38. Pridmore, D., Rekhif, N., Pittet, A.-C., Suri, B. & Mollet, B. 1996. *Variacin, a New Lanthionine-Containing Bacteriocin Produced by Micrococcus varians: Comparison to Lacticin 481 of Lactococcus lactis*. Applied and Environmental Microbiology, 62 : 1799–1802
39. 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*. Public Library of Science for everyONE, 3 : 2335

40. 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
41. Rheinheimer, G. 1987. Traducción de Romero, J. *Microbiología de las aguas*. Editorial Acribia, 1987, Zaragoza España : 73-79
42. Rodicio, M. R. & Mendoza, M. 2004. *Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22: 238-245
43. Seong, C. N., Choi, J. H. & Baik K.-S. 2001. *An Improved Selective Isolation of Rare Actinomycetes from Forest Soil*. *The Journal of Microbiology*, 39: 17-23
44. Sogin, M. L., Morrison H. G., Huber J. A., Welch A. M., Huse S. M., Neal P. R., Arrieta J. M. & Herndl G. J. 2006. *Microbial diversity in the deep sea and the underexplorer "rare biosphere"*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 32: 12115-12120
45. Soriano, B. B. & Soriano, B. E. 2010. *Degradación de pesticidas por Actinomycetos*. *Revista Científica de la Universidad César Vallejo*, 2: 34-37
46. 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. *Environmental Microbiology*, 5: 828-841
47. 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
48. Staley J. T., Gunsalus R. P., Lory S. & Perry J. J. (eds). 2007. *Microbial Life*. Sinauer Associates Inc. 30-35
49. Thomson, R. & Bertram, H. 2001. *Laboratory diagnosis of central nervous system infections*. *Infectious Disease Clinics of North America*, 15: 1047-1071

50. Wheelis, M. 2008. *Principles of modern microbiology*, Jones and Bartlett Publishers, USA.: 2, 5, 49-56, 140, 191-192, 293-304, 310-311, 362, 369, 372-373, 452-454
51. White, D. 2007. *The physiology and biochemistry of prokaryotes*. Oxford university press, 3rd Edition: 19-23, 50
52. Whitman, W., Coleman, D. & Wiebe, W. 1998. *Prokaryotes: the unseen majority*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95: 6578 – 6583
53. Wiley, N. W. & Schneewind 1999. *Surface Proteins of Gram-Positive Bacteria and Mechanisms of Their Targeting to the Cell Wall Envelope*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 63: 1092-2172
54. Woese, C., Kandler, O. & Wheelis, M. 1990. *Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 87: 4576–4579
55. Zhi, X.-Y., Li W.-J & E. Stackebrandt. 2009. *An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59: 589–608

7) APÉNDICE

Medios de cultivo

Las cantidades de reactivo están indicadas para preparar un litro de medio con agua bidestilada y esterilizarlo a 121 °C, 15 min a 15 lb de presión.

- **Medio GYM**
 - Dextrosa 4 g
 - Extracto de levadura 4 g
 - Extracto de Malta 10 g
 - Carbonato de Calcio 2 g
 - Agar 12 g

pH: 6.8-7.2 (con KOH)
- **Medio GYEA**
 - Dextrosa 10 g
 - Extracto de levadura 10 g
 - Agar 12 g

pH: 6.8-7.2
- **Medio OA**
 - Avena 20 g
 - Sales traza 1 mL
- **Medio YEME**
 - Extracto de levadura 3 g
 - Extracto de Malta 3 g
 - Bacto Peptona 5 g
 - Glucosa 10 g

pH: 7.0 - 7.2
- **Medio Mueller-Hinton**
 - Mezcla de componentes 38 g
- **Medio Base para Gelosa Sangre**
 - Mezcla de componentes 40 g