



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

(QUÍMICA ACUÁTICA)

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ACTINOMICETOS ASOCIADOS A
SEDIMENTOS MARINOS DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

YESSICA PARERA VALADEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ALEJANDRA PRIETO DAVO
FACULTAD DE QUÍMICA (UNAM) UNIDAD DE QUÍMICA SISAL

COMITÉ TUTOR: DRA. IRMA E. SORIA MERCADO
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

DRA. LETICIA ARENA ORTÍZ
FACULTAD DE CIENCIAS (UNAM) UNIDAD ACADÉMICA SISAL

DR. ERNESTO PÉREZ RUEDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA (UNAM)

DR. PABLO VINUESA FLEISCHMANN
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS (UNAM)

SISAL, YUCATÁN. DICIEMBRE 2015



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.



**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ACTINOMICETOS
ASOCIADOS A SEDIMENTOS MARINOS DE LA PENÍNSULA DE
YUCATÁN**

T E S I S

que para obtener el grado académico de

**MAESTRO EN CIENCIAS
(QUIMÍCA ACUÁTICA)**

Presenta

YESSICA PARERA VALADEZ

Director de Tesis: Dra. ALEJANDRA PRIETO DAVÓ

Comité Tutorial: Dra. MARÍA LETICIA ARENA ORTIZ

Dr. PABLO VINUESA FLEISCHMANN

Dra. IRMA ESTHELA SORIA MERCADO

Dr. ERNESTO PÉREZ RUEDA

SISAL, YUCATÁN. DICIEMBRE DE 2015

EL presente trabajo fue realizado gracias al apoyo económico recibido del proyecto PAPIIT (TA200212-2) "Evaluación biológica y filogenética de medios ambientes costeros como fuente de nuevos productos naturales marinos", el cual fue realizado en el Laboratorio de Bioprospección Marina de la Unidad Académica Sisal.

DEDICATORIA

A mis padres Aurora Valadez y Enrique Parera, gracias por apoyarme incondicionalmente, gracias amarme tanto!

A todas aquellas personas que conocí en Sisal y no dudaron en brindarme su amistad: A la familia de Carmiña: Doña Lu y Don Carlos.

A mis compañeros del cubículo de maestría Ariadna Sánchez, Goyo, Martín Arena, Humberto López, Rubén Zepeda, Álvaro Barreto, Magui, a mis queridas “Hula Girls”, Veronica Rivero, Erika Garnelo, Artur, Yaz, Dra Diana, Jacob Rubio, Sarai, la parce Estefi, Araceli Patoni y todos los de la UMDI Sisal.

A mis queridas “Machorritas” y Gabriela, que aunque no estén físicamente, las llevo en el alma.

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial al CONACYT por la beca otorgada que facilitó la realización de este proyecto.

A mi directora de tesis Dra Alejandra Prieto Davó, por el apoyo en todo momento durante la realización de este trabajo, sus consejos, observaciones y una grata amistad.

A mi comité tutorial por las observaciones y contribuciones para la realización del escrito.

Un agradecimiento especial a la M. en C. Karla Escalante Herrera por el apoyo brindado en todas las técnicas de biología molecular, así como por su infinita paciencia y sus valiosos consejos.

Al técnico de Laboratorio, M. en C. Korynthia López por todo el apoyo brindado en el trabajo de laboratorio y la determinación de nutrientes, las buenas charlas y su amistad.

A mis compañeros de laboratorio Yolitzin Rodríguez, Abraham Aguilar, Jesús Aviles, Adriana Rivero, Jennie Ramírez, Enrique Bohórquez, Dawrin Pech, Adanely, Carmen, al Dr Alejandro Yam, Natalia por los consejos, las enseñanzas y apoyo.

ÍNDICE

RELACIÓN DE FIGURAS	3
RELACIÓN DE TABLAS	5
ABREVIATURAS	6
GLOSARIO	7
INTRODUCCIÓN	8
ANTECEDENTES	10
Actinomicetos marinos	10
Sedimentos y nutrientes.....	15
Interacción sedimento-bacteria	16
JUSTIFICACIÓN	17
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
MATERIAL Y MÉTODOS	19
Trabajo en campo	19
Obtención de cepas.....	20
Análisis de nutrientes presentes en sedimento.....	21
Métodos moleculares.....	21
Alineamiento de Secuencias	22
Determinación de Unidades Taxonómicas Operacionales	23
Análisis de Diversidad	23
Comparación de secuencias con las bases de datos SILVA e EZTaxon.....	23
Análisis Filogenético	24
Análisis UniFrac.....	24
Prueba de crecimiento en agua destilada	25
RESULTADOS	26
Identificación de actinomicetos cultivables	26

Análisis de nutrientes y diversidad	30
Pruebas de crecimiento en agua destilada	37
DISCUSION	38
Identificación de actinomicetos cultivables	38
Análisis de nutrientes y diversidad	42
Pruebas de crecimiento en agua destilada	46
CONCLUSIONES	48
PERSPECTIVAS	49
BIBLIOGRAFÍA	50

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1. Mapa del área de muestreo y número de muestras por localidad.....	19
Figura 2. Abundancia de OTUs presentes por localidad.....	27
Figura 3. Árbol filogenético obtenido a partir de 38 representantes de las OTUs (97%) conformadas por secuencias parciales (900 pb) del gen ADNr 16S. Se utilizó el método de Máxima Verosimilitud con Bootstrap de 1000 repeticiones y se muestran valores > 50 en los nodos. Se presenta el número de colección para cada representante de las OTUs. Los nombres en cursivas representan las cepas tipo más cercanas a las secuencias utilizadas con el número de acceso correspondiente (EzTaxon). La estrella violeta señala que dicha OTU posee miembros que no presentaron crecimiento en medio de cultivo preparado con agua destilada. <i>Bacillus sp.</i> fue utilizada para dar raíz al árbol.	29
Figura 4. Curva de acumulación de OTUs generada utilizando el estimador de riqueza Chao1. Chao1: riqueza estimada, Sobs: riqueza observada.	31
Figura 5. Clúster obtenidos a partir de la matriz de similitud creada con el coeficiente de Bray-Curtis.	31
Figura 6. Análisis multidimensional (NMDS) que representa la matriz de similitud y las categorías de nutrientes correspondientes al porcentaje de Carbono Orgánico Total. PDL: por debajo del límite de detección, AP: alto porcentaje (COT > 1%), y BP: bajo porcentaje (COT <1%).....	32
Figura 7. Análisis multidimensional (NMDS) que representa la matriz de similitud y las categorías de nutrientes correspondientes al porcentaje de Nitrógeno Total. PDL: por debajo del límite de detección, AP: alto porcentaje (NT > 0.4%), y BP: bajo porcentaje (NT <0.4%).....	33
Figura 8. Árbol de clados conformados por las localidades estudiadas utilizando la diversidad filogenética como parámetro de comparación, la línea roja indica un soporte de validez de más del 99% obtenido mediante la prueba estadística Jackknife (Localidades: RL: Río Lagartos, Can: Cancún, Dz: Dzilam, Ak: Akumal, Bchi: Banco Chinchorro, Boc: La Bocana, Mah: Mahahual, Che: Chelém, Cel:	

Celestún, Hx: Holbox, Pm: Puerto Morelos, Coz: Cozumel) (Ambiente: lag: Laguna costera, arr: Arrecife, pm: pastos mairnos, are: arena, pla: playa).....34

Figura 9. Análisis multidimensional (NMDS) que representa la matriz de distancias UniFrac y las categorías de nutrientes correspondientes al porcentaje de Carbono Orgánico Total. PDL: por debajo del límite de detección, AP: alto porcentaje (COT > 1%), y BP: bajo porcentaje (COT <1%).35

Figura 10. Análisis multidimensional (NMDS) que representa la matriz de distancias UniFrac y las categorías de nutrientes correspondientes al porcentaje de Nitrógeno Total. PDL: por debajo del límite de detección, AP: alto porcentaje (NT > 0.4%), y BP: bajo porcentaje (NT <0.4%).....35

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla I. Clasificación de OTUs según su género.	27
Tabla II. Valor promedio del porcentaje de nutrientes presentes por localidad (PDL=por debajo del límite de detección, *Materia orgánica total).	30
Tabla III. Valores de p obtenidos mediante la métrica UniFrac. Los valores más cercanos a 0 indican la diferencia significativa entre la comunidad de una localidad con respecto a las demás.	36
Tabla IV. Cepas pertenecientes al género <i>Streptomyces</i> por localidad que presentaron nulo (--) o poco crecimiento (+/-) en medio de cultivo preparado con agua destilada después de un periodo de 96 horas de incubación.	37

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
AP	Alto porcentaje
ANOSIM	Analysis Of Similarity
BP	Bajo porcentaje
COT	Carbono orgánico total
DNTPs	Desoxirribonucleótido trifosfato
KOH	Hidróxido de potasio
LPSN	List of procaryotic names with standing in nomenclature
NMDS	Non-metric Multidimensional Scaling
NT	Nitrógeno Total
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDL	Por debajo del límite de detección
OTU	Unidad taxonómica operacional
Sobs	Riqueza observada

GLOSARIO

Bioactivo	Relativo o perteneciente a una sustancia que tiene un efecto en el tejido vivo o causa una reacción en él.
Bioprospección	Búsqueda dirigida de organismos (macro o micro) con capacidades económicas útiles, como la producción de nuevos fármacos, enzimas, etc.
Biorremediación	Cualquier proceso que utilice microorganismos, hongos, plantas o las enzimas derivadas de ellos para retornar un medio ambiente alterado por contaminantes a su condición natural.
Chao 1	Estimador del número de especies en una comunidad basado en el número de especies raras en la muestra.
Gap	Espacios vacíos entre las bases que conforman una secuencia de ADN.
Gram +	Tipo de célula procariota cuya pared celular está compuesta básicamente por peptidoglicano y que carece de membrana externa.
Metabolito secundario	Compuesto orgánico que no tiene un rol directo en el crecimiento o reproducción de un organismo, pero que pueden brindar ventaja competitiva.
Remineralización	Transformación de moléculas orgánicas a inorgánicas mediante procesos biológicos.

INTRODUCCIÓN

El estudio de la diversidad microbiana siempre se ha considerado atractivo e importante debido a la gran capacidad metabólica que poseen los microorganismos, en especial las bacterias. Estos organismos procariotas son capaces de degradar y producir una cantidad inimaginable de compuestos químicos, así mismo, la vida en el planeta depende de procesos microbianos. Es por esto que conocer la composición de la comunidad microbiana, su distribución en el ambiente y los factores que alteran dicha composición posee ventajas tanto para su explotación como para la conservación de la biósfera misma (Øvreås, 2000).

En años recientes, la industria farmacéutica ha reconocido la importancia de explorar la diversidad de las comunidades microbianas para maximizar el descubrimiento y diversidad química de los metabolitos secundarios que en ella se producen (Singh y Pelaez, 2008). En este contexto y gracias al avance tecnológico que ha permitido tanto el desarrollo de herramientas moleculares como la exploración del océano, ha sido posible enfocar los estudios bioprospectivos hacia bacterias marinas los cuales han cobrado fuerza debido a la exitosa obtención de productos naturales bioactivos con estructuras químicas novedosas (Jensen *et al.*, 2005b; Manivasagan *et al.*, 2013b). Otras de las razones que respaldan dichas investigaciones son la presencia cosmopolita de las bacterias en el océano y la gran diversidad de especies disponible para estudio (Bull *et al.*, 2005). Una gran ventaja que nos ofrecen los microorganismos es su capacidad de adaptación, lo que permite cultivarlas en condiciones de laboratorio y obtener grandes volúmenes de biomasa (Madigan *et al.*, 2003). Desafortunadamente, los estudios de cultivo han demostrado que solamente entre el 1-10% de las bacterias que se observan en un microscopio son cultivables, por lo que existe un extenso porcentaje “incultivable” que aún falta cubrir para estudiar a fondo el potencial metabólico de toda una comunidad (Head *et al.*, 1997; Bull, 2004).

Los sedimentos marinos componen 2/3 partes del área de la superficie de la tierra y representan un extenso hábitat gracias al área y volumen que abarcan

(Teske, 2013). En ellos es posible encontrar de 2000 a 3000 especies bacterianas por muestra de sedimento (Hong *et al.*, 2006), número poco conservador que revela la gran riqueza y diversidad existente. Dentro de esta gran diversidad se encuentra la Clase Actinobacteria (comúnmente conocidos como actinomicetos), bacterias Gram-positivas con alto contenido de guanina y citosina en su genoma cuyo papel ecológico es el de degradación de materia orgánica (Manivasagan *et al.*, 2013a).

Específicamente, los actinomicetos representan el grupo de bacterias más prolífico para la industria farmacéutica puesto que se han logrado obtener una gran cantidad de productos naturales con distintas actividades biológicas, basta con mencionar que más del 80% de compuestos antibacteriales descritos y caracterizados hasta el día de hoy han sido obtenidos a partir de miembros del género *Streptomyces* (Bérdy, 2005; Jensen *et al.*, 2005b; Bull y Stach, 2007). La presencia de actinomicetos en sedimentos marinos ha sido bien documentada y se ha observado que conforman una parte metabólicamente activa de la población microbiana endémica del sedimento. (Weyland, 1969; Moran *et al.*, 1995). Más aún, la importancia biotecnológica de los géneros estrictamente marinos que han sido recientemente descritos, como *Salinispora* y *Marinispora*, se demuestra en la amplia variedad de productos naturales con estructuras químicas novedosas y con actividades antibacteriales y antitumorales (Kwon *et al.*, 2006; Gulve *et al.*, 2012).

A pesar de que nuestro país cuenta con 11,122 km de litoral, la diversidad de actinomicetos marinos que encontramos en nuestros océanos ha sido muy poco estudiada (Maldonado *et al.*, 2009; Torres-Beltrán *et al.*, 2012; Becerril-Espinosa *et al.*, 2013). La zona costera de la Península de Yucatán es un área que no ha sido estudiada aún, por lo que el potencial biotecnológico de las comunidades de actinomicetos en los sedimentos de sus costas no ha sido evaluado.

En este contexto, el presente trabajo pretende investigar la identidad de los actinomicetos que se encuentran asociados a los sedimentos marinos de la Península para evaluar el extenso y lo novedoso de su diversidad. Al mismo tiempo, se pretende conocer si ésta se encuentra influenciada por la presencia de

nutrientes (C y N). Esto es, se obtendrá información acerca de las características de los nutrientes presentes en los sedimentos para explorar la correlación que tienen estos valores con la proliferación de comunidades de actinomicetos en zonas costeras para que, en caso de existir una correlación, se puedan dirigir los futuros esfuerzos de bioprospección a las zonas que presenten características prometedoras para el aislamiento de cepas novedosas.

ANTECEDENTES

Actinomicetos marinos

Los actinomicetos marinos son considerados como una fuente importante de compuestos con actividad biológica gracias al exitoso aislamiento de compuestos con nuevas estructuras químicas y con propiedades diferentes e inusuales con respecto a sus congéneres terrestres (Jensen *et al.*, 2005a). La búsqueda de dichas bacterias se ha llevado a cabo en diversos ambientes y se han desarrollado numerosas técnicas con la finalidad de obtener y cultivar especies nuevas y poco comunes (Hames y Uzel, 2012).

Como se mencionó anteriormente, los actinomicetos son un grupo de bacterias aeróbicas Gram + con alto contenido de Guanina y Citosina dentro de su ADN; su clasificación taxonómica las coloca dentro de la clase Actinobacteria (Stackebrandt *et al.*, 1997) y el orden Actinomycetales (Buchanan, 1917), de este último se deriva el nombre común de “actinomicetos”. Dicho orden posee, hasta el día de hoy, alrededor de 46 familias y 310 géneros descritos de acuerdo con el portal List of Prokaryotic names with standing in nomenclature (Euzéby, 1997). Una de sus características principales es la formación de micelio aéreo ramificado, similar al de los hongos, que les permite la colonización de substratos lejos de su centro de crecimiento (Torres-Beltrán *et al.*, 2012). Además, producen esporas asexuales con ciclos de vida muy complejos (Prescott, 2002; Manivasagan *et al.*, 2013a). Son generalmente saprófitas (Goodfellow y Williams, 1983) y se pueden encontrar en diversos ambientes y presentar fenotipos variados (Manivasagan *et al.*, 2013a). Su papel ecológico dentro de los ecosistemas incluye: la

remineralización y reciclaje de nutrientes (Sirivasan *et al.*, 1991), una fuente de alimento de niveles tróficos superiores y, la formación de humus mediante la descomposición de materia orgánica recalcitrante como queratinas, ligninas y quitinas (Goodfellow y Williams 1983; McCarthy y Williams, 1992). En el medio marino su importancia radica en la participación en ciclos biogeoquímicos ya que son degradadores de materia orgánica y aportan nutrientes indispensables para sustentar la productividad primaria a lo largo de la columna de agua (Kouridaki *et al.*, 2010).

La característica más peculiar de los actinomicetos y que los convierte en objeto de investigación es su gran capacidad de producción de metabolitos secundarios, de hecho, son considerados como el grupo más prolífico en cuanto a producción de compuestos con actividad biológica en comparación con otros taxa bacterianos (Tiwari y Gupta, 2012; Zotchev, 2012). Destaca el género *Streptomyces*, puesto que cerca del 80% de todos los metabolitos bioactivos reportados de actinomicetos provienen de él, así como tres cuartas partes de la producción total de antibióticos comercialmente utilizados hasta ahora (Cundliffe 1989; Kieser *et al.*, 2000; Jensen *et al.*, 2005a). Se cree que la expresión genética del metabolismo secundario se dispara por ciertos factores ambientales como lo son la competencia, la escases de alimentos, la protección del organismo hospedero o bien la comunicación entre células (Challis y Hopwood, 2003; Keller y Surette, 2006). Por ejemplo, aproximadamente un 6% del genoma de *Streptomyces avermitilis* se compone por grupos de genes involucrados en el metabolismo secundario, además de poseer un cromosoma único en tamaño y estructura (Omura *et al.*, 2001). Más aún, se cree que la transferencia lateral de genes involucrados en el metabolismo secundario ha coadyuvado a la exitosa adaptación de los actinomicetos a distintos ambientes (Jensen *et al.*, 2007).

Por muchos años y debido a la inaccesibilidad al medio marino, los actinomicetos se consideraban habitantes exclusivos del medio terrestre, en especial del suelo, mientras que el océano era calificado como un ambiente demasiado hostil y escaso de nutrientes, incapaz de albergar a estos microorganismos (Özcan *et al.*, 2013). Inclusive, el aislamiento del medio marino

se consideraba como un resultado de la germinación de esporas provenientes de los continentes y depositadas en el océano a través del intercambio de agua y aire (Goodfellow y Haynes, 1984). A pesar de que este argumento es válido, la existencia de géneros estrictamente marinos con necesidad obligada de sodio para su crecimiento ya ha sido documentada (Maldonado *et al.*, 2005a). Esto, sumado a la capacidad de adaptación que poseen en general las bacterias, sugiere la presencia de comunidades de actinomicetos autóctonas a sedimentos marinos, perfectamente adaptadas a la presión, a la escases de nutrientes (oligotróficos) y a bajas temperaturas propias de este ambiente (Moran *et al.*, 1995; Williams, 2008; Karthik *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011). Más aún, los actinomicetos de origen marino han sido obtenidos utilizando distintos medios de cultivos y se han observado utilizando herramientas moleculares que permiten la identificación genética independiente de cultivos.

El primer reporte que documenta la presencia de actinomicetos en sedimentos marinos muestra su distribución en el Mar del Norte y en el océano Atlántico (Weyland en 1969). El mismo autor sugiere que los actinomicetos marinos son una fuente importante de productos naturales con propiedades y estructuras diferentes a las reportadas en el medio terrestre. Años más tarde, la primera descripción de una especie estrictamente marina fue realizada por Helmke y Weyland, quienes caracterizaron a *Rhodococcus marinonascens* (Helmke y Weyland, 1984). De acuerdo con estudios de identificación y diversidad, los actinomicetos son bacterias dominantes en los sedimentos marinos (Gulve y Deshmukh, 2011). Karthik y colaboradores (2012), mencionan que, hasta el momento, se han reportado 83 especies cultivables de actinomicetos de hábitats marinos, las cuales pertenecen a 28 géneros distintos, siendo los *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Nocardia* y *Rhodococcus* los más comúnmente reportados, aunque no todos ellos con representantes estrictamente marinos (Weyland, 1969, 1981; Goodfellow y Haynes, 1984; Pisano *et al.*, 1989; Colquhoun *et al.*, 1998; Kokare *et al.*, 2004).

A finales de la década de los noventa y debido a la disminución en el aislamiento de nuevos compuestos a partir de actinomicetos de origen terrestre, la

bioprospección del medio marino ganó atención por parte de la comunidad científica y se observó un aumento de estudios con actinomicetos de origen marino con la finalidad de obtener compuestos novedosos (Fenical *et al.*, 1999; Lam, 2006). Esto, sumado al desarrollo de nuevas técnicas moleculares que permiten el estudio de poblaciones no cultivables, coadyuvaron a la descripción de nuevas especies marinas, incluidos miembros de los géneros *Dietzia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Salinispora*, *Marinophilus*, *Solwaspora*, *Salinibacterium*, *Aeromicrobium*, *Williamsia* y *Verrucosisspora*, entre otros (Magarvey *et al.*, 2004; Bull *et al.*, 2005; Jensen *et al.*, 2005b; Mincer *et al.*, 2005). Cabe destacar que el género *Salinispora* es el primero en considerarse estrictamente marino debido a su requerimiento de sodio para el crecimiento. Fue descubierto por Mincer y colaboradores en el 2002 y descrito por Maldonado y colaboradores en el 2005 y de él se han obtenido diversos compuestos incluyendo el compuesto anticancerígeno salinosporamide A (Fehling *et al.*, 2003), que se encuentra en fase II de estudios clínicos de la Food and Drug Administration (FDA, USA).

Existen numerosos ejemplos del aislamiento exitoso de compuestos bioactivos obtenidos a partir de actinomicetos marinos. Manivasagan y colaboradores (2013b) mencionan, como ejemplo, 46 compuestos bioactivos a partir de cepas de actinobacterias marinas y propone a los géneros *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Streptoverticillium*, *Actinoplanes*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora* y *Streptosporangium* como los más prolíficos en cuanto a la producción de compuestos antimicrobianos.

En años recientes, la investigación de los actinomicetos asociados a sedimentos marinos en las costas mexicanas se ha desarrollado notablemente. Primero, en el 2002, mediante un estudio realizado con métodos dependientes de cultivo y a partir de sedimentos del Mar de Cortés (Golfo de California), se reportó la presencia del género *Salinispora* (Mincer *et al.*, 2002). Justo en el mismo sitio, Martin y colaboradores (2007), mediante el uso de distintos medios de cultivo, confirmaron la presencia de los géneros *Salinispora* y *Marinispora*, así como la dominancia de miembros del género *Streptomyces*, siendo un miembro de este

último, el responsable de la producción de los compuestos citotóxicos denominados marmicina A y B.

Uno de los trabajos más completos realizados con muestras de sedimento, tanto del Golfo de México como del Mar de Cortés, fue el realizado por Maldonado y colaboradores en 2009. En dicho trabajo se probaron 17 medios de cultivo diferentes y se obtuvieron alrededor de 300 cepas de distintos géneros incluyendo: *Actinomadura*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Micromonospora*, *Nonomuraea*, *Rhodococcus*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Salinispora*, *Streptomyces*, “*Solwaraspora*” y *Verrucosipora*, con lo que aumentó notablemente el número de géneros reportados en costas de nuestro país.

Los trabajos más recientes fueron realizados con muestras del Pacífico y del Golfo de California, específicamente en Bahía de Todos Santos, Bahía Concepción y Bahía de los Ángeles. Para el primer sitio reportado se documentó el cultivo de los géneros *Streptomyces*, *Micromonospora* y *Nocardia*, mientras que para los sitios restantes se obtuvo además el género *Salinispora*. En estos estudios se demostró la actividad antibacteriana y citotóxica de los extractos de cepas cultivadas (Becerril *et al.*, 2012; Torres *et al.*, 2012).

En 2013, Becerril y colaboradores complementaron el estudio de la diversidad en el Golfo de California con muestras de sedimentos obtenidas en San Felipe y en la Bahía de Loreto. En este estudio se lograron cultivar cepas pertenecientes a ocho géneros: *Micromonospora*, *Nonomuraea*, *Salinispora*, *Verrucosipora*, *Actinomadura*, *Saccharomonospora*, *Streptomyces* y *Nocardiosis*. Más aún, algunas de las cepas del género *Streptomyces* podrían representar nuevas especies (Becerril *et al.*, 2013).

Es claro que los mares de México albergan una gran diversidad de actinomicetos y es por ello que se debe continuar con los estudios de bioprospección en localidades poco exploradas e implementar nuevas técnicas de aislamiento y cultivo para explotar ampliamente el potencial biotecnológico que poseen.

Sedimentos y nutrientes

Una manera con la que se pretende generar información relacionada con las condiciones ambientales que afectan la diversidad de actinomicetos presentes en sedimentos costeros, es la descripción del medio en donde habitan mediante la observación y registro de las condiciones ambientales que ejercen presión sobre sus poblaciones.

Los sedimentos son ambientes relativamente estables, conformados por partículas provenientes de la erosión de rocas, restos de organismos o compuestos precipitados químicamente (Tarbuck y Lutgens, 2005), lo que los convierte en ambientes ricos en minerales y en el mayor reservorio de materia orgánica del planeta (Calva y Torres, 2000). A diferencia de los suelos terrestres, los sedimentos se encuentran completamente cubiertos por una capa de agua, ya sea el océano, un río o cualquier cuerpo de agua. Los microorganismos bentónicos consumen el oxígeno al degradar la materia orgánica, una vez agotado el oxígeno, los sedimentos no perturbados de las capas inferiores permanecen en un ambiente anóxico (Nealson, 1997). En las zonas costeras, aproximadamente el 50% del carbono orgánico que se precipita en los sedimentos proviene de la productividad primaria, mientras que la otra mitad se deriva de restos de organismos, aportes terrígenos, y excreciones extracelulares de eucariotas (Wollast, 1991; Kordel *et al.*, 1997;

Por otro lado, el nitrógeno orgánico presente en los sedimentos puede provenir, al igual que el carbono orgánico, de aportes terrígenos, de material vegetal o fitoplancton y de varios procesos bacterianos que se encargan de transformar el nitrógeno inorgánico a formas asimilables para otros organismos (Escobar *et al.*, 2009). Uno de estos mecanismos es la fijación del nitrógeno, la cual consiste en la reducción enzimática del N_2 a NH_3 , NH_4^+ o a cualquier compuesto orgánico nitrogenado y que es llevado a cabo principalmente por cianobacterias. Más aún, el nitrógeno sufre una regeneración mediante procesos de hidrólisis y desaminación, con lo que se genera nitrógeno amoniacal que se reincorpora como nutriente a la columna de agua (Nealson, 1997).

Interacción sedimento-bacteria

Como ya se mencionó anteriormente el sedimento marino es el mayor reservorio de materia orgánica disponible en el Planeta y es un ambiente relativamente estable a diferencia de la columna de agua. Sin embargo también posee presiones para los microorganismos que allí habitan, como por ejemplo, la concentración de nutrientes, puesto que no es estática y muchas veces se ve influenciada por el tipo y tamaño de sedimento dominante. Cuanto más pequeño sea el tamaño de grano, mayor será la presencia de nutrientes debido a que las moléculas se adsorben más fácilmente a granos finos (Doyle y Sparks, 1979).

A pesar de que los gradientes ambientales influyen directamente las poblaciones bacterianas en los sedimentos (Dale, 1974), existen muy pocos estudios al respecto. Ahora se sabe que el tamaño de las partículas del sedimento también es un factor determinante en la abundancia de las poblaciones bacterianas debido a que entre menor tamaño de grano, mayor superficie de colonización (Cammen, 1982).

Existen estudios en los que se ha propuesto que el alto contenido de materia orgánica en sedimentos finos se encuentra relacionado con la abundancia de bacterias debido a que la materia orgánica sirve como fuente de la abundancia de bacterias debido a que la materia orgánica sirve como alimento (Ruble y Dornseif, 1978). Si bien los sedimentos finos pueden poseer mayor contenido de materia orgánica, eso hace más probable que albergue mayor abundancia bacteriana. Para el caso del estudio de los actinomicetos marinos, Bredholt y colaboradores (2007), realizaron un estudio con sedimentos provenientes del fiordo Trondheim, Noruega, a partir del cual concluyeron que efectivamente los valores más altos de materia orgánica (COT y NOT) se asociaron con los sedimentos más finos, aunque no existió relación alguna con la diversidad y cantidad de cepas cultivadas. Sin embargo, el porcentaje de carbono orgánico sí se vio relacionado directamente con la bioactividad de las cepas, es decir, la muestra con mayor contenido de carbono fue la que presentó las cepas con mejor bioactividad.

JUSTIFICACIÓN

A pesar de que el océano se ha considerado por varios años como una fuente de recursos naturales que pareciera ser inagotable, la microbiología de los mares no había sido tomada en cuenta como un bien del cual pueda obtenerse un beneficio importante para la sociedad. Sin embargo, el aislamiento exitoso de compuestos bioactivos a partir de cepas bacterianas marinas, ha cambiado la visión que hoy se tiene de estos microorganismos. La diversidad de bacterias que habitan el océano es mucho mayor a la de cualquier otro ecosistema (Committee on the Ocean's Role in Human Health, 1999), sin embargo, solamente se ha logrado caracterizar menos del 1% de su totalidad (Tiwary y Gupta, 2012). Este pequeño porcentaje ha sido suficiente para demostrar su importancia en varias ramas de la biotecnología, en especial, los actinomicetos son las bacterias más prolíferas en cuanto a la producción de metabolitos secundarios con bioactividad y se sabe que son capaces de sintetizar compuestos antibacterianos, herbicidas, antiparasitarios, pesticidas y enzimas útiles en tratamientos de biorremediación. (Chandrakant *et al*, 2011; Deepa *et al.*, 2013).

Para explotar los beneficios que nos brindan las comunidades bacterianas de zonas costeras y los compuestos químicos que producen, es necesario conocer la diversidad cultivable que en ellas existe y explorar la relación que ésta tiene con las características ambientales de cada localidad. De esta manera se pretende obtener información ambiental que pueda dirigir futuras investigaciones de cultivo intensivas en las que aumente la probabilidad de obtener cepas distintas a las que actualmente han sido descritas. Con ello se pretende también aumentar el potencial biotecnológico de los futuros estudios de bioprospección de actinomicetos en zonas costeras.

La Península de Yucatán constituye una región del país que se caracteriza por su riqueza y diversidad de especies (Arias y Montiel, 2010), su variedad de ecosistemas y un amplio litoral. Todos estos factores convierten a la Península en un lugar ideal para la búsqueda de nuevos actinomicetos de origen marino. El presente estudio revelará la diversidad de actinomicetos cultivables asociados a

los sedimentos marinos de la zona costera de Yucatán y, además de promover el manejo sostenible de las zonas costeras, pretende determinar las localidades más adecuadas para realizar estudios futuros de bioprospección en los que se tenga una mayor probabilidad de éxito en el aislamiento de nuevas cepas con potencial biotecnológico.

OBJETIVO GENERAL

Describir la diversidad filogenética de los actinomicetos cultivables de sedimentos marinos de la zona costera de la península de Yucatán y determinar si las distintas concentraciones de carbono y nitrógeno orgánicos presentes en los mismos pueden ser utilizadas como indicadores de diversidad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conocer la diversidad filogenética de actinomicetos cultivados a partir de sedimentos costeros en distintas localidades de la Península de Yucatán.
- Determinar las concentraciones de COT y NT presentes en los sedimentos de las localidades estudiadas
- Determinar si las concentraciones de COT y/o NT en sedimentos pueden ser utilizadas como indicadores de la diversidad y/o abundancia y/o novedad filogenética de actinomicetos cultivables asociadas a ellos

MATERIAL Y MÉTODOS

Trabajo en campo

Se realizaron muestreos de enero de 2012 a marzo de 2013 alrededor de la zona costera de la Península de Yucatán incluyendo un crucero oceanográfico a bordo del RV Walton Smith de la Universidad de Florida a lo largo de las costas del Caribe. Las localidades muestreadas durante este periodo fueron: Akumal, Banco Chinchorro, Cancún, Chelém, Celestún, Cozumel, Dzilam de Bravo, Holbox, Mahahual, La Bocana, Puerto Morelos y Río Lagartos (Figura 1). Las muestras de sedimento se obtuvieron en un intervalo de profundidad de entre 2 y 39 m. La colecta de las muestras fue realizada mediante buceo-scuba o bien mediante draga (draga portátil diseñada modelo No. 214WA110; Kahlisco, El Cajon, CA) dependiendo de la profundidad. Para el primer caso, la capa superficial de sedimento (2 cm) fue removida mediante una espátula para posteriormente tomar la muestra de sedimento deslizando una bolsa whirlpack estéril. Las muestras fueron transportadas en hieleras y refrigeradas a 4 °C hasta ser procesadas en las instalaciones del laboratorio de Química A, en la Unidad Académica Sisal, Yucatán. Las muestras de cada localidad fueron procesadas por separado.

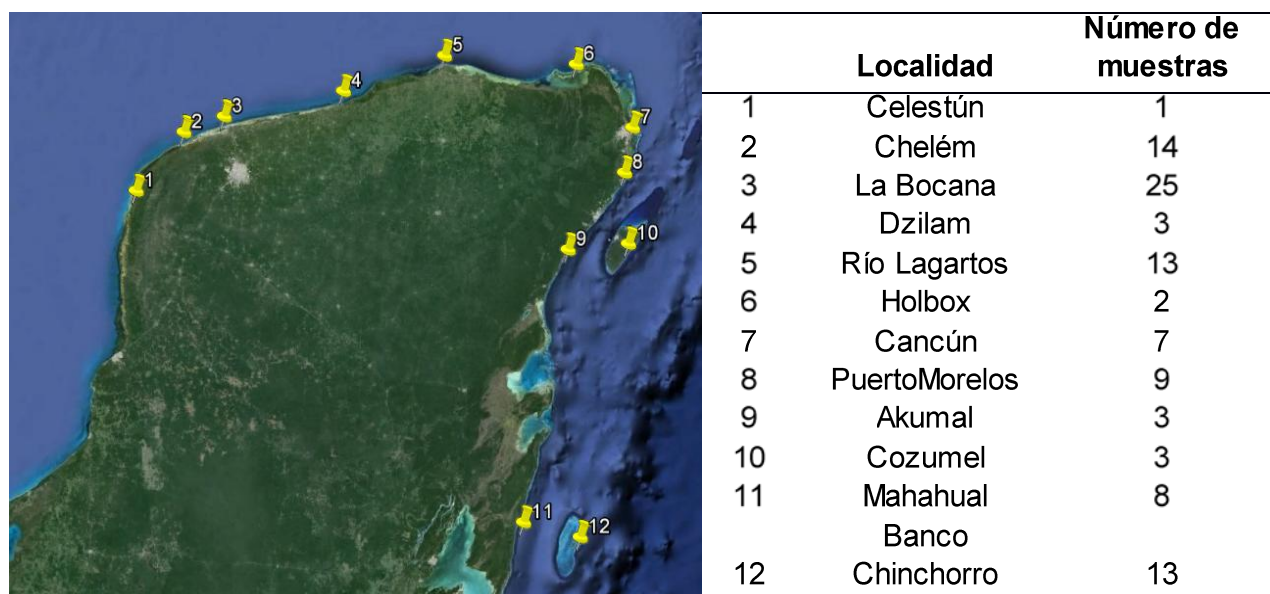


Figura 1. Mapa del área de muestre y número de muestras por localidad

Obtención de cepas

Para la obtención de cepas se procesaron 5g de sedimento que fueron secados en cajas de Petri semi-cerradas bajo una campana de flujo laminar. Una vez secos, se tomó un poco de sedimento con una esponja circular, la cual fue “estampada” en forma circular a lo largo de las cajas Petri con la finalidad de disminuir la cantidad de sedimento en cada presión de la esponja sobre la caja, a manera de dilución. Los medios de cultivo utilizados se prepararon con agar Marino y 2g Peptona, 10g Almidón y 4g extracto de levadura en 1 L de agua de mar (medio A1), y además se adicionaron 10 mg/mL (concentración final) de Ciclohexamida (antifúngico) y uno de los antibióticos: Rifampicina 5 mg/mL, (concentración final) o Gentamicina 10 mg/mL (concentración final) para evitar el crecimiento de bacterias Gram -. Las placas se dejaron incubar por una semana a una temperatura de 28° C.

Una vez observado crecimiento, las cepas fueron analizadas bajo un microscopio estereoscópico y seleccionadas con base en su morfología colonial; aquellas colonias con una apariencia “aterciopelada”, con formas plegadas y filamentos ramificados con o sin hifa aérea, fueron consideradas como actinomicetos de acuerdo a lo sugerido en la literatura (Jensen *et al.*, 1991; Prieto-Davó *et al.*, 2008). Las colonias seleccionadas fueron aisladas en medio de cultivo A1 utilizando el método de siembra en estría. Para la confirmación del grupo Gram, se realizó la prueba de Hidróxido de Potasio (KOH) para identificar cepas Gram + (Powers, 1995). Dicho método consiste en colocar una pequeña porción de la colonia bacteriana sobre un portaobjetos, posteriormente se le añade una gota de KOH al 3% con el objetivo de observar un efecto en la viscosidad de la cepa, debido a las características de la membrana celular, las bacterias Gram + tienden a diluirse, mientras que las Gram – forman una capa viscosa fácilmente detectable (Powers, 1995). Una vez resembrada y purificada, la cepa fue cultivada nuevamente en medio líquido para la obtención de biomasa. Finalmente las cepas fueron criogenizadas en glicerol al 20% para su preservación.

Análisis de nutrientes presentes en sedimento

La determinación de nitrógeno total y carbono orgánico total se realizó mediante un analizador elemental (Costech elemental combustión system mod: ECS 4010). Primero las muestras de sedimento se secaron mediante liofilización en un liofilizador LABCONCO Benchtop Freezezone de 2.5 L, posteriormente se maceraron y se tamizaron con la finalidad de obtener granos más finos. Para la obtención del COT fue necesario llevar a cabo un pretratamiento con 10 mL de ácido clorhídrico (HCl) 1M en vasos de precipitado a peso constante.

El análisis elemental es una técnica que proporciona el contenido total de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre presente en un amplio rango de muestras de naturaleza orgánica e inorgánica tanto sólidas como líquidas. La técnica está basada en la completa e instantánea oxidación de la muestra mediante una combustión con oxígeno puro a una temperatura aproximada de 1000°C. Los diferentes productos de combustión CO₂, H₂O y N₂, son transportados mediante el gas portador (He) a través de un tubo de reducción y después son selectivamente separados en columnas específicas para luego ser desadsorbidos térmicamente. Finalmente, los gases pasan de forma separada por un detector de conductividad térmica que proporciona una señal proporcional a la concentración de cada uno de los componentes individuales de la mezcla. Los valores obtenidos se procesaron mediante hojas de cálculo en el software Microsoft Office Excel.

Métodos moleculares

Se realizó la extracción de ADN utilizando el método de lisis *in situ* y adsorción en sílice descrito por Rojas *et al.*, (2008). La presencia de ADN fue evaluada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con Gel Red.

Para la cuantificación de ADN se realizó una dilución 1:250 con agua destilada, y posteriormente fue homogenizada en un vórtex. Se leyeron absorbancias a 260 nanómetros con la ayuda de un espectrofotómetro y se calculó la concentración de ADN contenida en cada muestra mediante la siguiente fórmula: [] de ADN (µg/ml)= (DO₂₆₀)*(Factor de Dilución)*(50 µg/ml), DO= Densidad Óptica.

La amplificación del gen del ADNr 16S se realizó mediante Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los oligonucleótidos FC27 (5' TACGGCTACCTTGTTACGACTT 3') y RC1492 (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') de acuerdo con la metodología propuesta por Mincer *et al.* (2002).

La reacción de amplificación contenía 5 µL de buffer para PCR 5x (Reaction Buffer, PROMEGA), 0.5 µL del nucleósido deoxyribomonofosfato (dNTP's) 10 mM, 0.5 µL de cada oligonucleótido (27f y 1492), 0.2 µL de *Thermus Aquaticus* (Taq) polimerasa 5 u/µL (Sigma-Aldrich), 1 µL de la muestra de ADN y 17.05 µL de agua grado biología molecular (Sigma-Aldrich) para obtener un volumen total de 25 µL. El programa utilizado fue el siguiente: 10 min a 95 °C, 30 ciclos de 45 s a 94 °C, 45 s a 65 °C, 1 min a 72 °C, finalmente 10 min a 72 °C.

Los productos de PCR también fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con GelRedTM (Biotium), corridos durante 1 hora a 80 V. El gel fue visualizado en un transiluminador BioRad.

Los productos de PCR fueron enviados a la empresa MacroGen (Corea) para su purificación y posterior secuenciación. Una vez obtenidas las secuencias del gen ADNr 16S se visualizaron mediante el software Geneious 7.1.2 para determinar su calidad y cotejarlas en las bases de datos correspondientes.

Alineamiento de Secuencias

Las secuencias fueron estandarizadas a 900 pares de bases cortándolas para obtener una región que fuera compartida por todas. El alineamiento se realizó mediante la base de datos en línea SILVA en la modalidad SINA Online, los gaps fueron removidos utilizando el comando filter.seqs del software MOTHRU (Schloss *et al.*, 2009), finalmente se realizó una curación manual mediante el software GenDoc. Se realizaron dos alineamientos, uno que incluyó únicamente las secuencias de las cepas de actinomicetos de la Península de Yucatán y otro donde se incluyeron las secuencias de referencia obtenidas de la base de datos EzTaxon.

Determinación de Unidades Taxonómicas Operacionales

Para la conformación de Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU, por sus siglas en inglés) al 97%, se utilizó el software MOTHUR, mediante el comando cluster y el método de average neighbor (Schloss y Westcott, 2011). Se introdujo el alineamiento previamente obtenido y se elaboró una matriz de distancia con el comando dist.seqs para posteriormente obtener el agrupamiento de secuencias.

Análisis de Diversidad

Los análisis de diversidad fueron realizados mediante el software MOTHUR y Primer-E 6 (Clarke y Gorley, 2015); en el primero se creó un archivo extensión .count el cual sirve de archivo entrada para Primer-E. Los datos fueron normalizados mediante su transformación a raíz cuadrada para posteriormente elaborar una curva de acumulación de especies utilizando el estimador no paramétrico Chao1 y la riqueza observada. Con los datos normalizados también se creó una matriz de similitud utilizando el coeficiente de Bray-Curtis con la cual se realizó un análisis de clústers con su respectiva representación multidimensional (NMDS por sus siglas en inglés) y una prueba estadística de similitud (ANOSIM) con 999 permutaciones. Para incluir los metadatos (porcentaje de nutrientes) en los análisis estadísticos, fue necesario agruparlos en tres categorías: PDL: por debajo del límite de detección, AP: alto porcentaje (COT > 1%, NT > 0.4%), y BP: bajo porcentaje (COT <1%, NT <0.4%).

Comparación de secuencias con las bases de datos SILVA e EZTaxon

Cada secuencia fue comparada contra las bases de datos para conocer la identidad de su vecino más cercano. Se realizó una búsqueda en el sitio web SILVA (Quast *et al.*, 2013) en la modalidad SINA Online search and classify (Pruesse *et al.*, 2012) con un porcentaje de identidad mínima del 97% con la finalidad de obtener únicamente aquellas secuencias que presenten dicho porcentaje de similitud con respecto a la secuencia blanco. Las secuencias arrojadas por SILVA fueron filtradas mediante la suite CD-HIT (Li y Godzik, 2006; Fu *et al.*, 2012) en la modalidad cd-hit-est, con un porcentaje de identidad del

99.9% para eliminar los posibles duplicados. Por otra parte, la base de datos del EZTaxon realiza un análisis tipo BLAST más un algoritmo de alineamiento en pares, en este caso el programa arrojó la secuencia de la cepa tipo más cercana a la secuencia blanco.

Análisis Filogenético

El análisis filogenético se realizó tomando una secuencia representante de cada OTU obtenida mediante el comando `otu.rep` del software MOTHUR. Las 38 secuencias representantes junto con las cepas tipo correspondientes fueron alineadas como se describió anteriormente. Para la construcción del árbol filogenético se utilizó el programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013) usando el algoritmo del análisis de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood) con 1000 repeticiones Bootstrap y el modelo de corrección Tamura-Nei. El árbol obtenido se modificó mediante el software InkScape para claridad en las etiquetas de cada cepa. Se siguió la misma metodología para elaborar un árbol que contara únicamente las secuencias representantes de cada OTU para realizar análisis posteriores.

Análisis UniFrac

Los resultados de filogenia fueron utilizados para realizar una comparación entre comunidades microbianas de distintas localidades mediante el método UniFrac (Lozupone y Knight, 2005). Para dicho análisis fueron necesarios 3 archivos: el árbol filogenético con las secuencias representantes de cada OTU, una tabla de abundancias de cada OTU por localidad y un archivo con los metadatos de cada localidad. Los tres archivos fueron cargados en la plataforma de UniFrac para realizar los siguientes análisis: Cluster samples, Jackknife Cluster samples y UniFrac significance. Para todos los análisis las opciones "Weighted y Normalized" fueron elegidas con la finalidad de llevar a cabo un análisis cuantitativo normalizando la abundancia de secuencias, además se realizaron 1000 permutaciones en cada caso.

También se creó una matriz de distancia mediante la opción “Sample distance matrix”, dicha matriz se utilizó de la misma manera para realizar el análisis multidimensional y la prueba estadística ANOSIM bajo los mismos parámetros anteriormente descritos.

Prueba de crecimiento en agua destilada

Para conocer el grado de adaptación que tienen al agua de mar, las cepas previamente identificadas como miembros del género *Streptomyces* fueron sometidas a la prueba de crecimiento en agua destilada. Para ello se reactivó la cepa criogenizada en una placa con medio de cultivo A1; una vez observado el crecimiento, la cepa fue sembrada nuevamente en dos placas, una con medio A1 preparado con agua de mar y otra con el mismo medio de cultivo pero sustituyendo el agua de mar por agua destilada. Las placas se dejaron incubar a 28 °C durante 96 hrs o hasta detectar el crecimiento.

RESULTADOS

Identificación de actinomicetos cultivables

Se obtuvieron un total de 106 cepas a partir de 81 muestras provenientes de 12 localidades alrededor de la península de Yucatán (Figura 1) y se secuenció el gen 16S ribosomal de 91 de ellas (85%) debido a que el resto era inviable.

Las secuencias se agruparon en 38 OTUs de acuerdo con la similitud al 97% o más del gen 16S ribosomal que compartieron entre ellas. Se distribuyeron dentro de 12 géneros distintos: *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Dietzia*, *Nocardiopsis*, *Pseudonocardia*, *Verrucosipora*, *Actinomadura*, *Brachybacterium*, *Jiangella* y *Salinispora*. La mayoría de estas OTUs pertenecen al género *Streptomyces* (18 OTUs) seguido de *Salinispora* (5 OTUs), *Pseudonocardia* (3 OTUs) y *Jiangella* (3 OTUs) mientras que el resto de los géneros *Micromonospora*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Dietzia*, *Nocardiopsis*, *Pseudonocardia*, *Verrucosipora*, *Actinomadura* y *Brachybacterium*, solamente presentaron una o dos OTU como máximo (Tabla I). La localidad que presentó mayor número de OTUs fue La Bocana y la mayoría de éstas pertenecieron al género *Streptomyces*, seguida de Cancún, Akumal y Río Lagartos las cuales, a diferencia de La Bocana, presentan OTUs diferentes a *Streptomyces* (Figura 2).

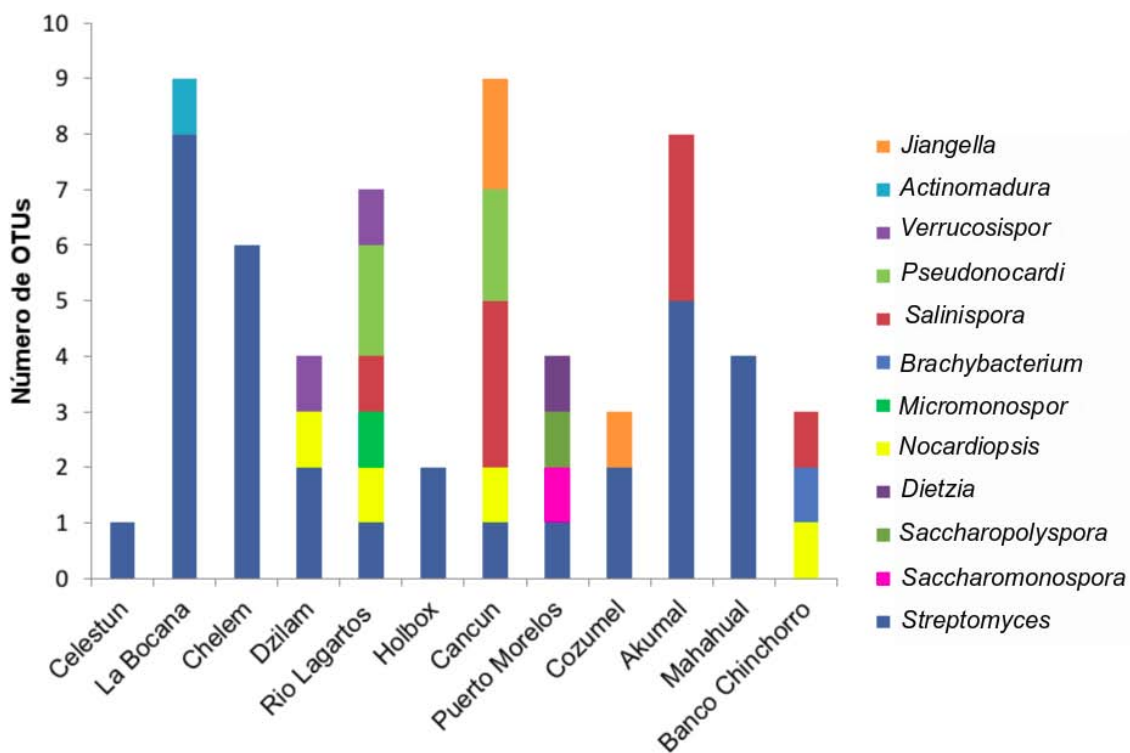


Figura 2. Abundancia de OTUs presentes por localidad.

Tabla I. Clasificación de OTUs según su género.

Género	OTUs	Secuencias
<i>Streptomyces</i>	18	55
<i>Salinispora</i>	5	12
<i>Pseudonocardia</i>	3	4
<i>Jiangella</i>	3	3
<i>Nocardiosis</i>	2	7
<i>Saccharopolispora</i>	1	1
<i>Saccharomonospora</i>	1	1
<i>Dietzia</i>	1	1
<i>Actinomadura</i>	1	1
<i>Brachybacterium</i>	1	1
<i>Micromonospora</i>	1	1
<i>Verrucosisor</i>	1	5

La Figura 3 muestra la relación filogenética que comprueba la posición taxonómica de las 38 OTUs obtenidas durante este estudio de bioprospección. Se observa la conformación de cuatro grandes clados: uno en el cual sólo se agrupa el género *Streptomyces*, y otros tres en los que se distribuyen el resto de los géneros.

Dentro del género *Streptomyces* se observa la formación de cuatro clados, en los cuales existen miembros que no presentaron crecimiento en medio de cultivo elaborado con agua destilada (estrella color violeta). Además, tanto la OTU 34 como la 36, conforman un clado bien soportado con una cepa descrita como marina, confirmando lo observado mediante la falta de crecimiento en medio de cultivo con agua destilada. Si bien las cepas fueron identificadas con porcentajes de similitud superiores al 98%, algunas OTU del clado de *Streptomyces* se agrupan de manera independiente. Las dos OTUs del género *Verrucosispora* se relacionan también con cepas de origen marino, mientras que para el género *Pseudonocardia*, dos de sus tres OTUs se relacionan directamente con una cepa marina (OTU18 y OTU17). Para el caso de las cepas del género *Jiangella*, se observa un clado bien soportado e independiente al de las cepas tipo. Finalmente, todas las OTUs del género *Salinispora* junto con sus vecinos cercanos son de origen marino.

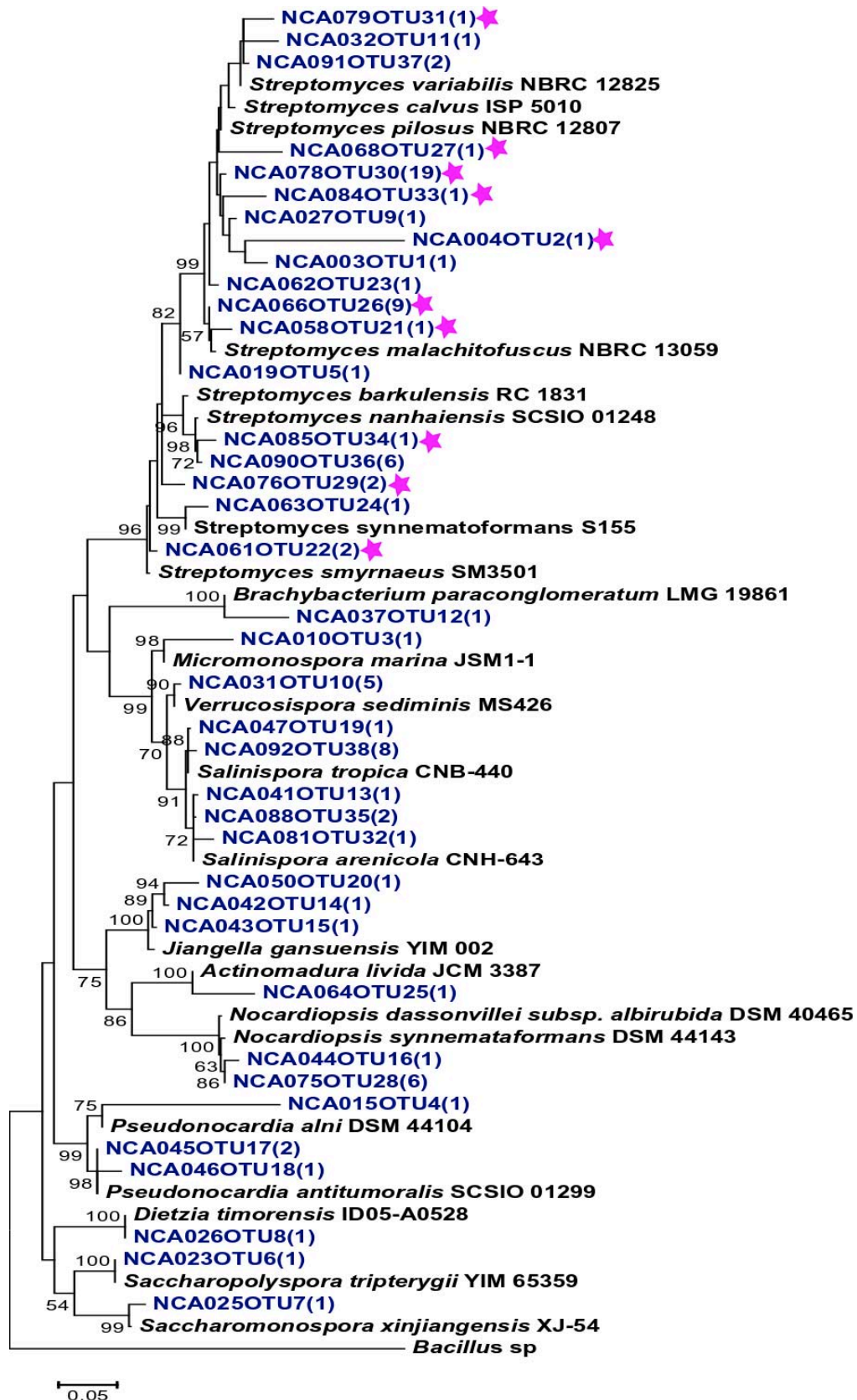


Figura 3. Árbol filogenético obtenido a partir de 38 representantes de las OTU's (97%) conformadas por secuencias parciales (900 pb) del gen ADNr 16S. Se utilizó el método de Máxima Verosimilitud con Bootstrap de 1000 repeticiones y se muestran valores > 50 en los nodos. Se presenta el número de colección para cada representante de las OTUs. Los nombres en cursivas representan las cepas tipo más cercanas a las secuencias utilizadas con el número de acceso correspondiente (EzTaxon). La estrella violeta señala que dicha OTU posee miembros que no presentaron crecimiento en medio de cultivo preparado con agua destilada. *Bacillus sp.* fue utilizada para dar raíz al árbol.

Análisis de nutrientes y diversidad

En la Tabla II se observan los valores de nutrientes obtenidos por localidad expresados en porcentaje (COT y NT). La localidad con el valor más alto de NT fue Chelém y la que presentó mayor COT fue Dzilam. Aquellos datos que fueron demasiado bajos como para ser detectados por el equipo se denominaron PDL D

Tabla II. Valor promedio del porcentaje de nutrientes presentes por localidad (PDL D=por debajo del límite de detección, *Materia orgánica total).

Localidad	COT (%)	NT (%)
Celestún	0.825*	0.458
Chelém	3.21	0.754
La Bocana	PDL D	0.539
Dzilam	6.22*	PDL D
Río Lagartos	2.00*	0.65
Holbox	0.45	0.05
Cancún	PDL D	0.01
Puerto Morelos	0.40	PDL D
Cozumel	PDL D	0.005
Akumal	PDL D	0.002
Mahahual	PDL D	0.16
Banco Chinchorro	PDL D	0.012

En la Figura 4 se observa la curva de acumulación de OTUs obtenida mediante el estimador de riqueza Chao1. La curva no es en su totalidad asintótica y la riqueza estimada (Chao1) se encuentra por encima de la observada (Sobs).

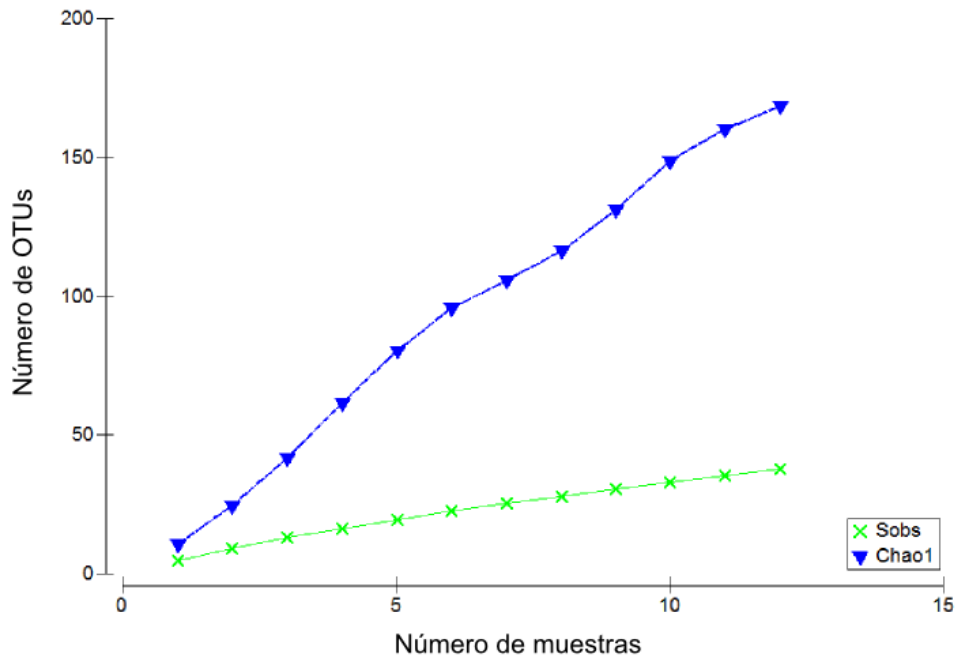


Figura 4. Curva de acumulación de OTUs generada utilizando el estimador de riqueza Chao1. Chao1: riqueza estimada, Sobs: riqueza observada.

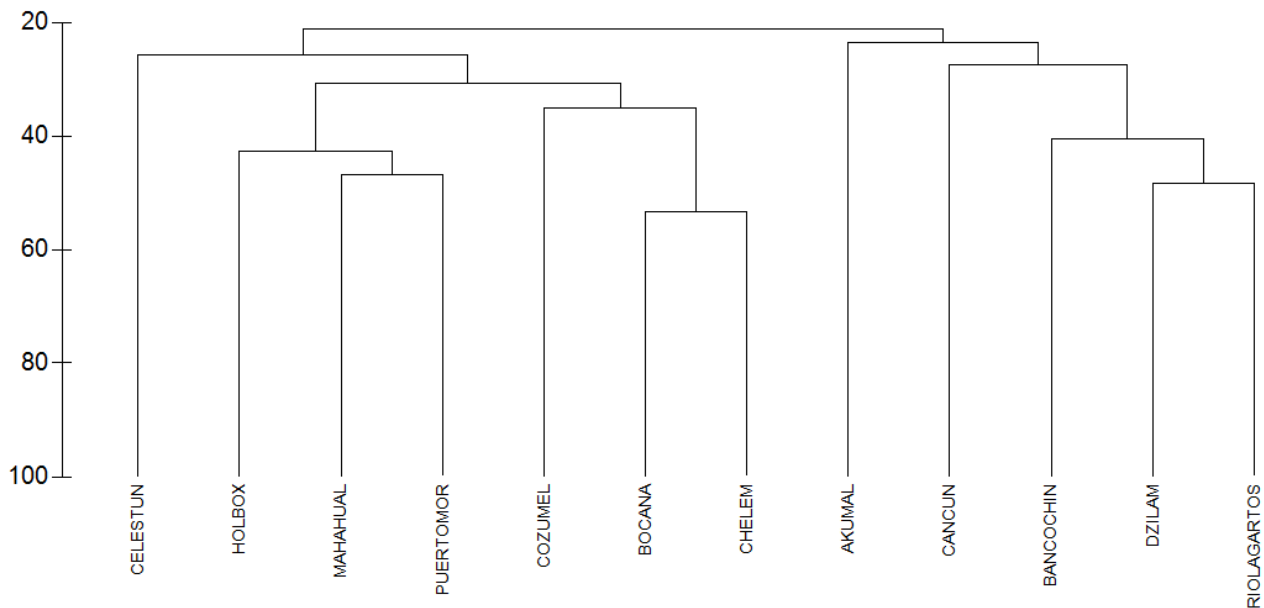


Figura 5. Clúster obtenidos a partir de la matriz de similitud creada con el coeficiente de Bray-Curtis.

De acuerdo con la distribución de OTUs presentes en cada comunidad y el análisis de clústers realizado a partir de una matriz de disimilitud de Bray-Curtis, la Figura 5 muestra la conformación de dos grandes clados, dentro de éstos se observa el agrupamiento de los sitios que son más similares entre sí dependiendo del número de OTUs compartidas y de la filogenia a la que corresponden. Se observa una clara separación de dos grandes grupos, uno con aquellas localidades que poseen un miembro de la familia Micromonosporaceae, como es el caso de los géneros *Salinispora*, *Verrucosisspora* y *Micromonospora*; y otro donde predomina el género *Streptomyces*. El análisis multidimensional (NMDS) confirma dicha distribución debido a que los valores de estrés se encuentran dentro del rango aceptado. En las Figuras 6 y 7 es posible observar que las localidades se distribuyen de manera independiente a las categorías de nutrientes sugiriendo que la observación hecha mediante el análisis de clusters es correcta y señala la separación de los géneros marinos. Debido a esto se asume que el agrupamiento de las localidades no se vio ligado a la presencia de algún nutriente. Más aún, esto se corrobora con el análisis estadístico ANOSIM puesto que no se obtuvieron valores significativos (%N: $P = 0.89$, $R = -0.18$; %COT: $P = 0.49$ y $R = -0.026$).

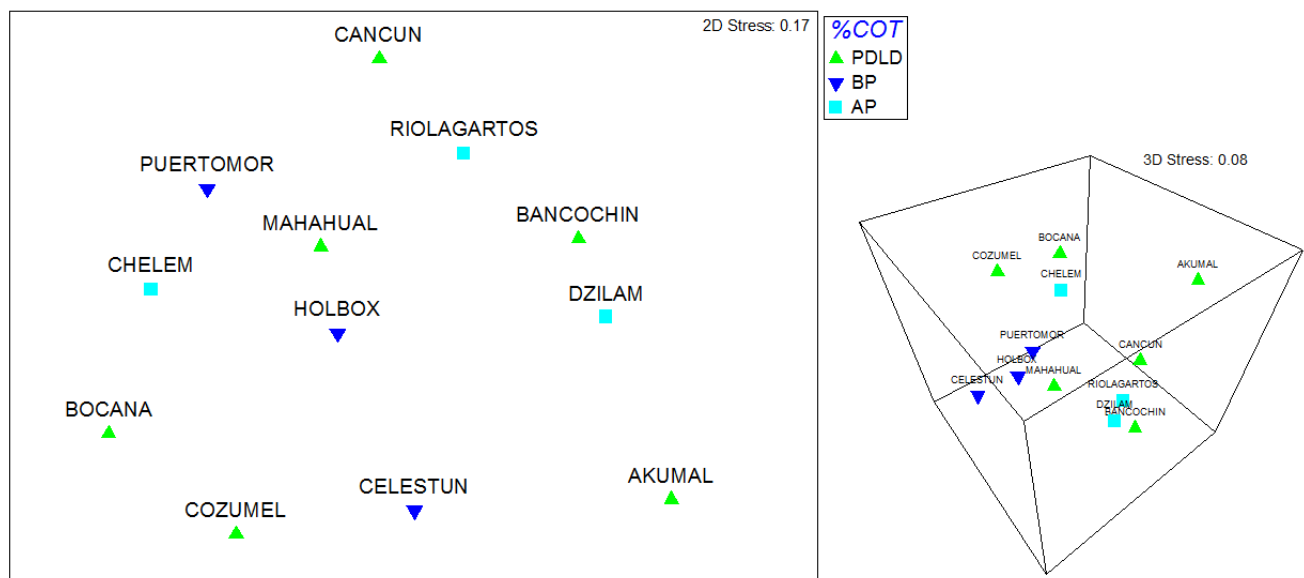


Figura 6. Análisis multidimensional (NMDS) que representa la matriz de similitud y las categorías de nutrientes correspondientes al porcentaje de Carbono Orgánico Total. PDL: por debajo del límite de detección, AP: alto porcentaje (COT > 1%), y BP: bajo porcentaje (COT < 1%).

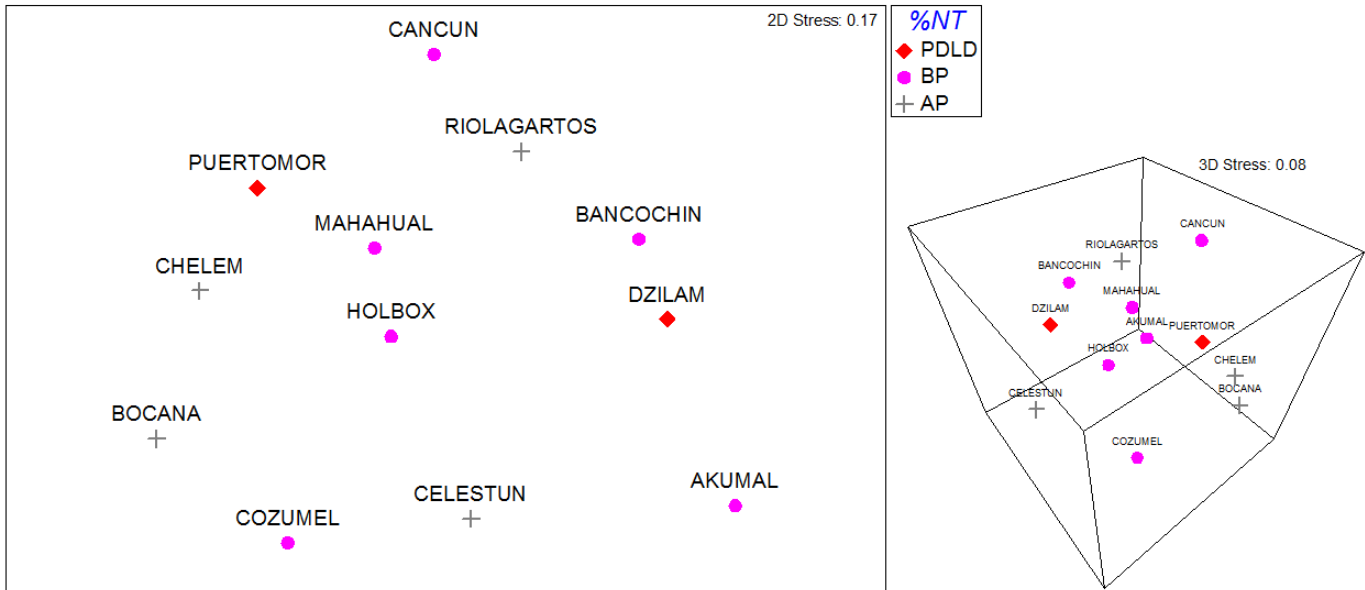


Figura 7. Análisis multidimensional (NMDS) que representa la matriz de similitud y las categorías de nutrientes correspondientes al porcentaje de Nitrógeno Total. PDL: por debajo del límite de detección, AP: alto porcentaje (NT > 0.4%), y BP: bajo porcentaje (NT < 0.4%).

El análisis de clusters Unifrac confirmó una vez más la separación de las localidades en dos grandes clados (Figura 8), el primero conformado por: Río Lagartos, Cancún, Dzilam, Banco Chinchorro y Akumal, en el cual se observa la separación de éste último con respecto al resto. En el segundo clado formado por: La Bocana, Mahahual, Chelém, Celestún, Holbox, Puerto Morelos y Cozumel. La prueba Jackknife realizada sobre el árbol de clados mostró que la validez estadística dentro de la separación los grupos se mantienen con más del 99%, mientras que en el interior de cada clado fue menos del 50%. Confirmando la observación previa de la separación entre OTUs estrictamente marinas y el resto de los géneros incluyendo *Streptomyces*.

El análisis dimensional (NMDS) realizado a partir de la matriz de distancia junto con las categorías de nutrientes tampoco mostró patrón alguno en cuanto a la distribución de las localidades con respecto a los nutrientes. En las Figuras 9 y 10 se observa una separación relativamente marcada entre las comunidades Cancún, Río Lagartos, Dzilam, Akumal y Banco Chinchorro. Para este caso, la

prueba ANOSIM fue, una vez más, no significativa (%N: $P = 0.88$, $R = -0.14$; %COT: $P = 0.48$ y $R = -0.031$, Figuras 9 y 10).

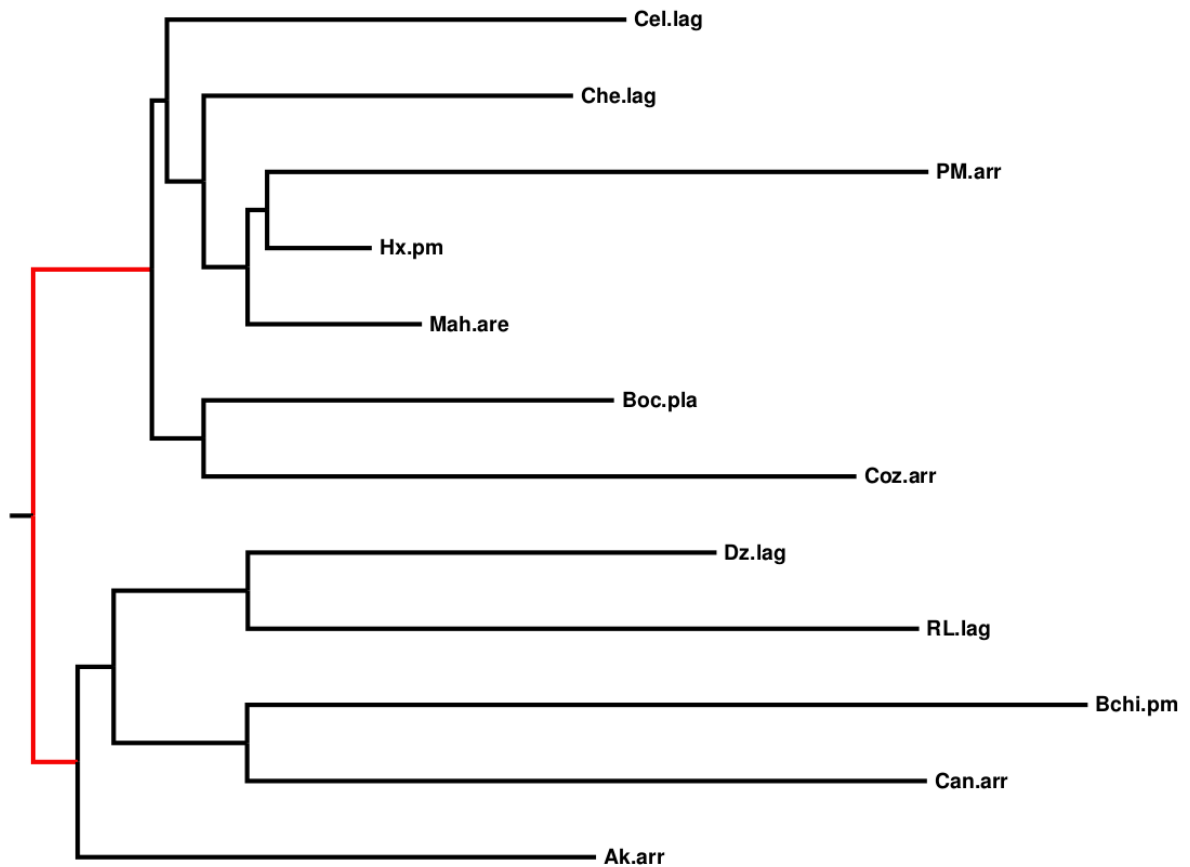


Figura 8. Arbol de clados conformados por las localidades estudiadas utilizando la diversidad filogenética como parámetro de comparación, la línea roja indica un soporte de validez de más del 99% obtenido mediante la prueba estadística Jackknife (Localidades: RL: Río Lagartos, Can: Cancún, Dz: Dzilam, Ak: Akumal, Bchi: Banco Chinchorro, Boc: La Bocana, Mah: Mahahual, Che: Chelém, Cel: Celestún, Hx: Holbox, Pm: Puerto Morelos, Coz: Cozumel) (Ambiente: lag: Laguna costera, arr: Arrecife, pm: pastos mairnos, are: arena, pla: playa).

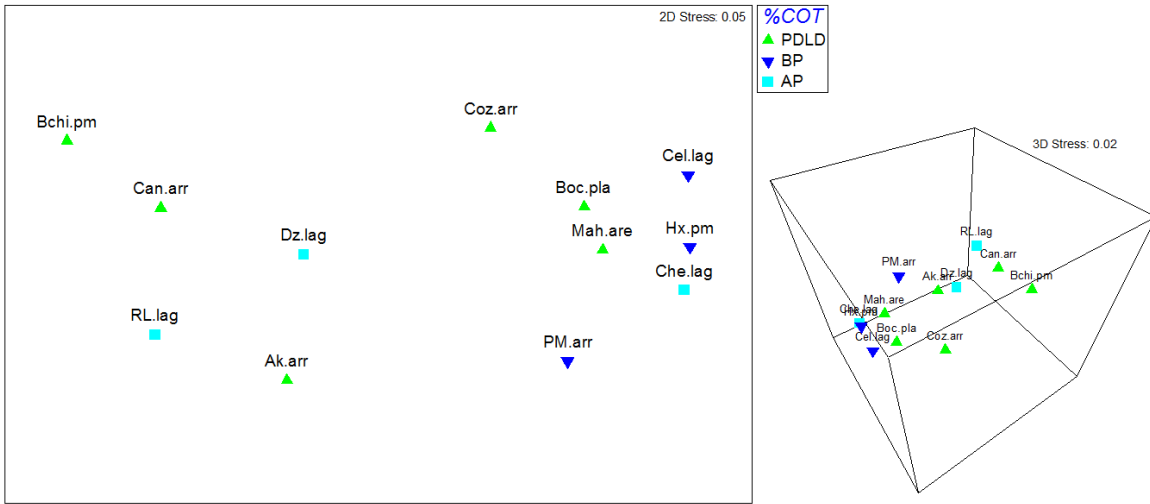


Figura 9. Análisis multidimensional (NMDS) que representa la matriz de distancias UniFrac y las categorías de nutrientes correspondientes al porcentaje de Carbono Orgánico Total. PDL: por debajo del límite de detección, AP: alto porcentaje (COT > 1%), y BP: bajo porcentaje (COT < 1%).

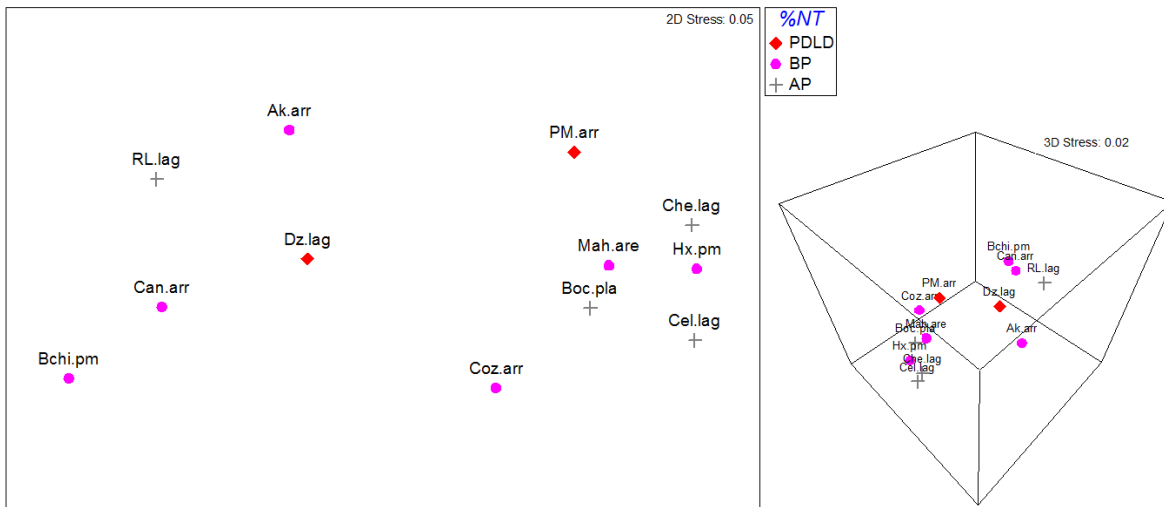


Figura 10. Análisis multidimensional (NMDS) que representa la matriz de distancias UniFrac y las categorías de nutrientes correspondientes al porcentaje de Nitrógeno Total. PDL: por debajo del límite de detección, AP: alto porcentaje (NT > 0.4%), y BP: bajo porcentaje (NT < 0.4%).

Finalmente en el análisis de significancia realizado con la métrica UniFrac, comprueba los resultados obtenidos en el análisis de clusters, destacando a Banco Chinchorro con un valor de p de 0.0 (significativo). Las otras localidades medianamente significativas fueron Río Lagartos y Chelém, con valores p de 0.01 y 0.08 respectivamente, mientras que el resto de las comunidades no se consideraron como diferentes de manera significativa.

Tabla III. Valores de p obtenidos mediante la métrica UniFrac. Los valores más cercanos a 0 indican la diferencia significativa entre la comunidad de una localidad con respecto a las demás.

Significancia UniFrac	
Muestras	Valor p
Akumal	0.66
Banco Chinchorro	0.0
La Bocana	0.307
Cancún	0.98
Celestún	0.93
Chelém	0.08
Cozumel	0.32
Dzilam	0.29
Holbox	0.64
Mahahual	0.19
Puerto Morelos	0.10
Río Lagartos	0.01

Pruebas de crecimiento en agua destilada

Los resultados obtenidos en la prueba de crecimiento en medio de cultivo elaborado con agua destilada para cepas del género *Streptomyces* se observan en la Tabla IV. La mayoría de las localidades contaron con cepas incapaces de crecer en ausencia de sales o presentaron poco crecimiento después del periodo de incubación. El crecimiento nulo parece predominar en las localidades que pertenecen al mar Caribe, destacando en la zona del Golfo de México, Chelém.

Tabla IV. Cepas pertenecientes al género *Streptomyces* por localidad que presentaron nulo (--) o poco crecimiento (+/-) en medio de cultivo preparado con agua destilada después de un periodo de 96 horas de incubación.

OTU	CEPA	LOCALIDAD	Crecimiento	OTU	CEPA	LOCALIDAD	Crecimiento
1	NCA003	Chelém	+/-	36	NCA051	Bocana	+/-
2	NCA004	Chelém	--	30	NCA012	RíoLagartos	+/-
22	NCA001	Chelém	--	30	NCA028	Holbox	--
26	NCA008	Chelém	--	30	NCA021	PuertoMorelos	+/-
30	NCA009	Chelém	--	30	NCA022	PuertoMorelos	--
30	NCA002	Chelém	--	30	NCA024	PuertoMorelos	--
30	NCA007	Chelém	--	29	NCA048	Cozumel	--
36	NCA006	Chelém	--	31	NCA079	Akumal	--
21	NCA058	Bocana	--	33	NCA084	Akumal	+/-
22	NCA061	Bocana	+/-	34	NCA085	Akumal	--
26	NCA060	Bocana	--	36	NCA090	Akumal	--
26	NCA055	Bocana	+/-	29	NCA076	Mahahual	+/-

DISCUSION

Identificación de actinomicetos cultivables

En los últimos años, el estudio enfocado a la exploración de nuevos ambientes para la obtención de cepas de actinomicetos “raras”, o distintas a las ya conocidas que posean la capacidad de producir nuevos compuestos con actividad biológica, ha sido adoptado por la comunidad científica como una alternativa prometedora para el desarrollo de nuevos fármacos. Conocer más acerca de la diversidad, distribución y ecología de los actinomicetos representa una ventaja para el aislamiento exitoso de cepas novedosas, en especial en el medio marino (Solano *et al.*, 2009).

La presencia de actinomicetos en los ecosistemas marinos ya ha sido bien documentada mediante estudios dependientes e independientes de cultivo (Mincer *et al.*, 2002; Jensen *et al.*, 2005b; Prieto-Davó *et al.*, 2013; Duncan *et al.*, 2014) y, es gracias a éstos trabajos que se han modificado las técnicas, tratamientos y medios de cultivo para lograr el aislamiento de la mayor cantidad de actinomicetos posible (Jensen y Lauro 2008). Como resultado del estudio de bioprospección de actinomicetos de la zona costera de la Península de Yucatán, se obtuvieron en total 106 cepas con morfología colonial típica de la clase Actinomycetales, número conservador si se compara con otros trabajos realizados en aguas marinas del país que van de 300 a 1497 (Maldonado *et al.*, 2009; Becerril-Espinosa *et al.*, 2013). Para la península de Yucatán, este trabajo representa el primer registro de actinobacterias en sedimentos marinos y es un punto de partida para futuros trabajos ecológicos y de bioprospección. En un total de 91 cepas secuenciadas y 38 OTUs obtenidas, se encontraron 12 géneros: *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Dietzia*, *Nocardiopsis*, *Verrucosispora*, *Actinomadura* y *Salinispora* que ya habían sido reportados con anterioridad en aguas mexicanas (Golfo de México y Golfo de California) (Martin *et al.*, 2007; Maldonado *et al.*, 2009; Becerril-Espinosa *et al.*, 2012; Torres-Beltrán *et al.*, 2012, Becerril-Espinosa *et al.*, 2013), y los géneros *Pseudonocardia*, *Jiangella* y *Brachybacterium*, cuya presencia ya ha sido detectada en el mediterráneo, el mar

amarillo y el mar caribe costarricense, siendo el primer registro para aguas mexicanas (Agogué *et al.*, 2005; Solano *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010). Al igual que en otros trabajos en sedimentos costeros, el género *Streptomyces* domina significativamente en las cepas de actinomicetos aislados de las costas yucatecas (Figura 2, Tabla I), confirmando que éste género es el más común dentro de ambientes marinos costeros (Kokare *et al.*, 2004; Duncan *et al.*, 2014). Este dominio es real ya que, aunque podría pensarse que el medio de cultivo selecciona a favor de los *Streptomyces*, se ha reportado ampliamente que la predominancia del género se pierde al alejarse de la costa, incluso utilizando el mismo medio de cultivo (Jensen *et al.*, 1991; Prieto-Davó *et al.*, 2008). A pesar de que se ha reportado que algunas fuentes de nitrógeno como la peptona, favorecen el crecimiento de cepas productoras de compuestos con actividad antibiótica, como lo es *Streptomyces* (Özcan *et al.*, 2013); en este estudio la presencia de dicho género no estuvo relacionada con ninguno de los nutrientes evaluados (%COT y %NT).

El segundo género más abundante fue *Salinispora*, ubicándose en las localidades de Río Lagartos, Cancún, Akumal y Banco Chinchorro (Figura 2 y Tabla I), confirmando la distribución pantropical de este género que ha sido propuesta por distintos investigadores desde el comienzo su estudio (Mincer *et al.*, 2002; Maldonado *et al.*, 2009; Freel *et al.*, 2013). Más aún, este género se caracteriza por la necesidad del ión sodio para su crecimiento, por lo que se le considera exclusivo del medio marino (Mincer *et al.*, 2002, Fenical y Jensen, 2006). Como se muestra en la Figura 3, se conforma un clado bien soportado con las cepas que fueron identificadas dentro del género *Salinispora*, en específico, con las especies *S. arenicola* y *S. tropica*, ambas especies con una amplia gama de compuestos activos reportados (Fehling *et al.*, 2003, Fenical *et al.*, 2009). Al igual que con *Streptomyces*, la presencia de *Salinispora* no se vio ligada a la concentración de nutrientes evaluados, sin embargo, los análisis de clusters muestran una clara separación entre las localidades de las cuales se aislaron cepas de este género y otros pertenecientes a la familia Micromonosporaceae, como es el caso de *Verrucosipora* y *Micromonospora* (Fig. 5 y 8), ambos con su

respectiva cepa tipo más cercana reportada como de origen marino (Dai *et al.*, 2010; Tanasupawat *et al.*, 2010). Más aún, los géneros *Verrucosispora* y *Micromonospora*, al igual que *Salinispora*, se consideran como una fuente importante de metabolitos bioactivos (Fenical y Jensen, 2006; Kwon *et al.*, 2006). Los análisis multidimensionales (Fig. 6, 7, 9, 10), sugieren que las localidades Akumal, Banco Chinchorro, Cancún, Dzilam y Río Lagartos presentaron una influencia mayor de cepas marinas que el resto de las localidades muestreadas. Ya que la adaptación al medio marino es una característica significativa en la selección de cepas de actinomicetos para el descubrimiento de productos naturales (Lam, 2006), es importante estudiar a todas las cepas aisladas de estas localidades para evaluar su producción de metabolitos secundarios con actividad biológica.

Los géneros restantes reportados en este trabajo se distribuyeron de manera puntual en una o máximo dos localidades (Figura 3). Los géneros *Actinomadura*, *Micromonospora*, *Jiangella*, *Pseudonocardia*, *Nocardiopsis*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Brachybacterium* y *Dietzia*, se consideran como “raros” y poco estudiados (Ward y Bora, 2006; Khanna *et al.*, 2011; Tiwari y Gupta, 2012; Li *et al.*, 2014) por lo que su evaluación en cuanto a la producción de metabolitos secundarios con actividad biológica también es importante.

Las secuencias obtenidas en este trabajo se agruparon dependiendo del porcentaje de similitud que comparten unas con otras (Schloss y Westcott, 2011). Debido a la falta de una definición concreta de especie bacteriana la creación de OTUs a partir de secuencias de la misma región y longitud del gen ADNr 16s en los estudios de comunidades microbianas permite realizar análisis más certeros de abundancia, riqueza y diversidad (Stach *et al.*, 2003; Patin *et al.*, 2013; Bunge *et al.*, 2014). Para este estudio, las OTUs fueron conformadas con un 97% de similitud entre secuencias, porcentaje ampliamente utilizado para definir a un nivel de especie en estudios de comunidades microbianas (Cai *et al.*, 2013; Kerfahi *et al.*, 2014; Papale *et al.*, 2012; Gülay y Smets 2015) basándose en el argumento que señala que dos organismos procariontes que comparten un porcentaje de

hibridación ADN:ADN mayor a un 70%, presentarán una similitud en sus secuencias del gen ADNr 16s mayor o igual al 97%, por lo que debería considerarse de la misma especie (Stackebrandt y Goebel, 1994; Stach y Bull, 2005; Vos, 2011). Sin embargo, en algunas ocasiones es difícil diferenciar dos especies basándose únicamente en la secuencia del gen 16S ribosomal, esto debido a al alto porcentaje de similitud que se puede presentar entre secuencias a pesar de presentar poca hibridación ADN:ADN (Rossello-Mora y Amann, 2001; Kim *et al.*, 2014). Por otra parte, se ha criticado el uso del gen ADNr 16s para clasificar organismos por arriba del nivel de género, debido a su alta conservación (Kämpfer, 2012), y a la alta velocidad a la cual ocurren las diferentes presiones ecológicas que dan origen a variaciones genéticas a nivel especie (Caro-Quintero y Konstantinidis, 2012). Cabe señalar que en el presente trabajo se utilizaron secuencias parciales del gen ribosomal 16S, las cuales permiten hacer inferencias ecológicas dentro de las comunidades microbianas, que para el caso, es la finalidad del presente. Si se contemplara un estudio taxonómico a fondo, sería necesario refinar las técnicas de identificación molecular para llegar a una clasificación certera a nivel de especie. La Figura 3 muestra el árbol filogenético que comprueba la clasificación taxonómica de cada OTU. Si bien los porcentajes de similitud con respecto a las bases de datos consultadas (SILVA y EZtaxon) son mayores a 98%, debido a los argumentos anteriormente citados, no se descarta la posibilidad de que alguna represente una nueva especie y/o produzca un compuesto novedoso. Como claro ejemplo, las especies *Salinispora tropica* y *S. pacifica*, a pesar de compartir un 99% de identidad a nivel genoma, producen metabolitos secundarios diferentes, por lo que obtener una amplia microdiversidad filogenética es también una buena estrategia en la búsqueda de productos naturales (Jensen *et al.*, 2007). Dentro del clado conformado por *Streptomyces*, se observa que se forman grupos internos bien soportados y que la mayoría de las OTUs se agrupan de manera independiente a la cepa tipo, respaldando la propuesta del aislamiento de nuevas especies en este trabajo. El resto de las cepas se distribuyen a lo largo de tres grandes clados, algunos agrupándose de manera independiente o dentro de la misma rama que su respectiva cepa tipo. Por

otra parte, la mayoría de las cepas tipo del clado *Streptomyces*, se han descrito a partir del medio terrestre, por lo que los resultados de crecimiento en medio de cultivo elaborado con agua destilada apoyan una vez más la hipótesis de que dichas cepas sean novedosas con respecto a las ya descritas (Tabla IV).

Análisis de nutrientes y diversidad

La curva de estimación de riqueza (Figura 4), indica que no se ha llegado a la asíntota esperada en un muestreo exhaustivo, por lo tanto, podría ser un indicativo de que es necesario seguir realizando muestreos o que es necesario utilizar distintos métodos de cultivo o tratamientos de muestra para lograr encontrar el total de actinomicetos presentes en las muestras y así maximizar el número de OTUs distintas con el número de muestras (métodos de cultivo) (Gotelli y Colwell 2011). Un muestro adecuado es una parte importante en el estudio de las comunidades microbianas puesto que de él dependen los análisis posteriores, en especial para ecosistemas marinos, ya que se requiere de un mayor esfuerzo para evitar sesgos en el número de muestras, que a su vez repercute en el conteo de especies (Wintzingerode *et al.*, 1997). En este trabajo se abarcaron 12 localidades a lo largo de la península de Yucatán, sin embargo, el muestro o procesamiento de muestras, no fueron suficientes para obtener la mayor diversidad de actinomicetos cultivables, por lo que se sugiere continuar realizando muestreos intensivos y usar un mayor número de métodos de cultivo en estudios posteriores.

Los análisis de disimilitud de Bray-Curtis, clústers y Unifrac permitieron conocer cuáles localidades eran más similares o más diferentes unas de otras utilizando como parámetro el número de OTUs compartidas con respecto a la cantidad de nutrientes (%NT y %COT) o bien la diversidad filogenética asociada a las secuencias parciales del gen ADNr 16s. Tanto el análisis de disimilitud de Bray-Curtis como los realizados en la suite UniFrac, señalan la separación de las localidades muestreadas en dos grandes poblaciones o clústers (Figura 5 y 8), lo que sugiere que dichas OTUs compartidas están relacionadas a nivel genético. A pesar de que el porcentaje de nutrientes (%COT y %NT) presentes en el

sedimento no influyó de manera significativa en la separación de dichas poblaciones (Figura 6, 7, 9 y 10), es posible observar que uno de los clusters parece estar conformado por OTUs que comparten un requerimiento de agua de mar para su crecimiento (Figura 5 y 8). Si bien la conformación de clusters se mantiene en ambas aproximaciones, no es la cantidad de nutrientes el factor que influye de manera directa, por lo que es posible que la adaptación al agua de mar sea la presión selectiva en el ambiente que los une. Otras investigaciones coinciden en que no existe relación entre parámetros físico-químicos en el sedimento y la composición de la comunidad microbiana cultivable (Duncan *et al.*, 2014), aunque Bredholt y colaboradores (2007) encontraron una relación entre el contenido de materia orgánica y la presencia de cepas del género *Streptomyces* con actividad antibiótica, hecho que podría corroborarse en estudios posteriores utilizando las cepas obtenidas en este trabajo.

En cuanto a las características ambientales de las localidades agrupadas en un mismo cluster, el primero se compone de las localidades de Dzilam, Río Lagartos, Cancún, Akumal y Banco Chinchorro, siendo las primeras dos partes del Golfo de México, mientras que el resto se localiza en el mar Caribe. Tanto Dzilam como Río Lagartos concuerdan con porcentajes de nutrientes relativamente altos, los cuales pueden ser producto de la eutroficación propia de los ambientes tipo laguna costera (Avramidis *et al.*, 2013) o del aporte de aguas provenientes de la red de acuíferos presentes en la península de Yucatán (Herrera-Silveira, 2006). A diferencia de Dzilam, Río Lagartos se caracterizó por ser unas de las zonas con mayor número de OTUs, además de sobresalir en el análisis de significancia Unifrac ($p= 0.01$), por lo que se considera como zona significativamente diferente. Una de las condiciones ambientales características de Río Lagartos es la hipersalinidad de sus aguas debido a la alta tasa de evaporación y poco aporte de agua dulce por parte del acuífero (Herrera-Silveira *et al.*, 1998; Valdes y Real 2004).

De las localidades Cancún, Akumal y Banco Chinchorro, destacan las primeras dos por poseer número alto de OTUs, mientras que Banco Chinchorro sobresalió en el análisis de significancia UniFrac ($p= 0.0$) y tiene la peculiaridad de

no contar con miembros del género *Streptomyces*. Esta última localidad se encuentra mucho más alejada de la costa que el resto, además de ser uno de los arrecifes de plataforma más importantes del Caribe y ser declarado Reserva de la Biósfera en 1996 (Villegas-Sánchez *et al.*, 2015). Al parecer, en este sitio existen características ambientales únicas que permiten el crecimiento de distintos grupos taxonómicos a los encontrados en el resto de las localidades. Esta separación geográfica podría estar acompañada de una evolución alopátrica que promueve una especiación (Lozupone *et al.*, 2007). Los sitios de Cancún y Akumal se localizan dentro de un corredor turístico de suma importancia económica, lo cual los hace vulnerables a un alto impacto antropogénico y su consecuente degradación ecológica (Barrera-Escorcia y Namihira-Santillán, 2004). Los nutrientes en estas zonas fueron escasos; se sabe que el sedimento propio de los arrecifes coralinos se compone en su mayoría de arenas carbonatadas, hecho que complica la detección del carbono orgánico, además, la permeabilidad de este tipo de sedimentos conlleva a una disminución en la concentración de carbono orgánico (Boudreau *et al.* 2001).

El segundo clúster está conformado por los sitios: Celestún, Chelém, La Bocana, Holbox, Puerto Morelos, Cozumel y Mahahual. De ellos, destacan La Bocana y Chelém por poseer mayor número de OTUs, en su mayoría pertenecientes al género *Streptomyces*, seguido por un número menor de OTUs de *Streptomyces* en las localidades de Celestún y Holbox. La primera coincide como una zona de nutrientes altos, sin embargo, en la segunda los porcentajes de NT y COT fueron bajos. La zona de Holbox se ha caracterizado previamente por valores bajos de compuestos nitrogenados, esto quizá debido a las corrientes marinas que circulan cerca de la costa. Por otra parte, en Celestún el aporte de nutrientes proviene de descargas de agua subterránea y aguas residuales provenientes de actividades turísticas (Herrera-Silveira, 2006). Tanto La Bocana como Chelém se encuentran en regiones hidroquímicamente similares, diferenciándose en el nivel de impacto antropogénico, puesto que Chelém está sujeta al mayor número de descargas de aguas residuales de toda la costa de Yucatán (Herrera-Silveira y Morales-Ojeda 2009), lo que podría relacionarse con

los resultados obtenidos en la significancia UniFrac, donde su valor p (Tabla III) la denomina como otra región significativamente diferente.

Los sitios Puerto Morelos, Cozumel y Mahahual también forman parte del corredor turístico del Caribe mexicano, por lo que sus ambientes también han sido afectados. La salinidad de sus aguas se considera constante, aunque ligeramente alta (Kjerfve, 1994; Chávez *et al.*, 2014). Al igual que los otros sitios muestreados dentro del Caribe, sus arenas son carbonatadas y permeables, con poco contenido de nutrientes (Tabla II).

Las 12 localidades muestreadas se distribuyen a lo largo de dos regiones oceanográficas distintas: el Golfo de México y el mar Caribe. La primer región se caracteriza por poseer una zona de surgencia, aguas someras y poco cálidas, y una gran influencia de descarga de aguas por parte del acuífero debido a la naturaleza kárstica de la península (Merino, 1997; Herrera-Silveira y Morales-Ojeda 2009). Por otra parte, los sitios muestreados en el mar Caribe se localizan dentro de la ecoregión que abarca el Sistema Arrecifal Mesoamericano (MACR por sus siglas en inglés), la cual se caracteriza por la presencia de sistemas arrecifales (Murray, 2007), sedimentos arenosos, alta energía física (oleajes y corrientes), alta salinidad, aguas cálidas y un acelerado impacto antropogénico producto de la creciente industria turística (Graizbord *et al.*, 2009; Chollett *et al.*, 2012). A pesar de que las localidades muestreadas forman parte de regiones oceanográficas distintas, las comunidades de actinomicetos aislados de sus sedimentos no muestrean una diferencia en diversidad filogenética, lo cual reafirma la teoría de la distribución cosmopolita de las bacterias en el océano (O'Malley, 2008). Esta teoría se sustenta en las características intrínsecas de las células procariotas como lo son: la alta tasa de mutación que poseen, el intercambio genético entre ellas, su tamaño microscópico, su fácil dispersión y sus bajas tasas de extinción (Fenchel, 2003). De esta manera, las comunidades bacterianas presentes en un sitio en específico se encuentran ahí en función de las propiedades físicas, químicas y biológicas del hábitat, no de las características geológicas e históricas del mismo (Fenchel y Finlay 2004).

Pruebas de crecimiento en agua destilada

En los últimos años se han descrito especies de actinomicetos estrictamente marinos, es decir, que requieren del ión Sodio para su crecimiento (Maldonado *et al.*, 2005a). Coincide que, estas mismas especies han resultado ser una fuente prometedora de compuestos bioactivos (Fehling *et al.*, 2003, Fenical *et al.*, 2009). Debido a la gran diversidad y abundancia de OTUs del género *Streptomyces* se llevaron a cabo estudios para conocer su dependencia al agua marina para el crecimiento y poder identificar aquellas cepas que presentan características de marinas estrictas. Con ello se pretende resaltar a las cepas que muestren adaptaciones al medio marino y por ende tengan una mayor probabilidad de representar nuevas especies. Tal es el caso de la descripción de la cepa *Streptomyces oceani* como nueva especie Tian y colaboradores (2012). En otros trabajos se ha documentado que, tanto el crecimiento óptimo como el incremento de actividad antibiótica, ocurren en medios de cultivo elaborados con agua de mar, o bien, adicionados con NaCl en concentraciones que varían de 0.5% a 3% (Tian *et al.*, 2012; Rashad *et al.*, 2015). Por ejemplo, el aislamiento exitoso del compuesto marinopirrol B a partir de una cepa marina de *Streptomyces* que requería agua de mar para su crecimiento (Hughes *et al.*, 2008).

De acuerdo con los resultados obtenidos, algunas cepas presentaron poco crecimiento en medio de cultivo elaborado con agua destilada. A pesar de que el género *Streptomyces* es tolerante a distintas concentraciones de sal (Rashad *et al.*, 2015), las cepas aisladas en este trabajo tienen similitud con cepas que provienen del medio terrestre probablemente debido a que, originalmente, las esporas han sido transportadas al medio marinos por diferentes procesos (Goodfellow y Haynes, 1984), sin embargo, el poco crecimiento en agua destilada sugiere que estos actinomicetos han comenzado una adaptación al medio marino. Tal es el caso de La Bocana y Chelém, donde las cepas presentaron nulo crecimiento en medio de cultivo preparado con agua destilada a pesar de la influencia terrestre originada por la descarga de aguas residuales que ocurre en estas zonas (Herrera-Silveira y Morales-Ojeda 2009).

Los otros sitios donde también se aislaron cepas de *Streptomyces* con nulo crecimiento en ausencia de sales fueron: Holbox, Puerto Morelos, Cozumel, Akumal y Mahahual. A pesar de que estos lugares han sufrido un acelerado crecimiento urbano y las descargas de aguas residuales al mar ha aumentado considerablemente (Baker *et al.*, 2010), las poblaciones de actinomicetos con adaptaciones al medio marino persisten y se ha documentado que dichas poblaciones son metabólicamente activas dentro de las comunidades bacterianas de los sedimentos marinos (Moran *et al.*, 1995).

CONCLUSIONES

- Los parámetros físico-químicos evaluados, en este caso los nutrientes Nitrógeno Total y Carbono Orgánico Total, no tuvieron influencia significativa en la distribución, abundancia y diversidad de las cepas de actinomicetos aisladas a partir de los sedimentos marinos.
- Los análisis realizados, tanto de diversidad como filogenéticos, señalaron la agrupación de dos grandes poblaciones genéticamente divergentes que pueden estar siendo seleccionadas por otros factores medioambientales.
- El análisis de significancia UniFrac sugiere que las localidades más divergentes genéticamente son Río Lagaros, Chelém y Banco Chinchorro, por lo que se podrán direccionar esfuerzos para realizar muestreos intensivos en dichos sitios.
- A pesar de haber identificado las cepas con porcentajes de similitud mayores al 98%, no se descarta la posibilidad de que representen nuevas especies debido a las presiones selectivas intrínsecas de cada comunidad.
- Las pruebas de crecimiento en agua destilada revelan la presencia de cepas adaptadas al medio marino, las cuales a pesar de estar sujetas a un alto impacto antropogénico, no han sido desplazadas.

PERSPECTIVAS

- Gracias al trabajo aquí descrito se sugiere rediseñar los métodos de muestreo. Hacer muestreos intensivos y trata de recolectar todos los metadatos posibles es de suma importancia para la validación de análisis posteriores.
- Todos los ambientes son interesantes porque tienen diferentes presiones. Cualquier ambiente puede representar una nueva fuente de actinomicetos novedosos.
- Se recomienda utilizar diferentes métodos de pretratamiento, así como diferentes medios de cultivo para rescatar una mayor diversidad, para rescatar la mayor diversidad posible de actinomicetos cultivables.
- Combinar las diferentes herramientas moleculares para lograr una identificación más certera. Usar oligonucleótidos más específicos para diferenciar de género a especie.
- Realizar una comparación con métodos independientes de cultivo para comparar con la riqueza cultivable y establecer conclusiones respecto a las comunidades de actinomicetos.

BIBLIOGRAFÍA

- Agogué, H., Casamayor, E., Bourrain, M., Obernosterer, I. Joux, F., Herndl y P. Lebaron. 2005. A survey on bacteria inhabiting the sea surface microlayer of coastal ecosystems. *FEMS: Microbial Ecology*, 54(2):269-80.
- Arias, L. y S. Montiel. 2008. La cacería tradicional en el Mayab contemporáneo: una mirada desde la ecología humana. *Avance y Perspectiva*, 1(1):21-27.
- Avramidis, P. Bekiari, V., Kontopoulos, N. y N. Kokidis. 2013. Shallow coastal lagoon sediment characteristics and water physicochemical parameters - Myrtari Lagoon, Mediterranean Sea, Western Greece. *Fresenius environmental bulletin*, 22(5): 1628-1635.
- Baker, D., E. Jordán-Dahlgren, M. Maldonado y C. Harvell. 2010. Sea fan corals provide a stable isotope baseline for assessing sewage pollution in the Mexican Caribbean. *Limnology and Oceanography*, 55(5): 2139-2149.
- Barrera-Escorcia, G. y P. Nahimira-Santillán. 2004. Contaminación microbiológica en la zona costera de Akumal, Quintana Roo, México. *Hidrobiológica*, 14(1): 27-35.
- Becerril-Espinosa, A., Guerra-Rivas, G., Ayala-Sánchez, N. e I. Soria-Mercado. 2012. Antitumor activity of Actinobacteria isolated in marine sediments from Todos Santos Bay, Baja California, México. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 47: 317-325.
- Becerril-Espinosa, A., Freel, K., Jensen, P.R. e I. Soria-Mercado. 2013. Marine Actinobacteria from the Gulf of California: diversity, abundance and secondary metabolite biosynthetic potential. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103: 809-819.
- Bérdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *The journal of antibiotics*, 58(1): 1-26.
- Bredholt, H., Fjaervik, E., Johnsen, G. y S. Zotchev. 2007. Actinomycetes from Sediments in the Trondheim Fjord, Norway: Diversity and Biological Activity. *Marine Drugs*, 6(1):12-24.
- Boudreau, B., Huettel, M., Forster, S., Jahnke, R., McLachlan, A., Middelburg, J., Nielsen, P., Sansone, F., Taghon, G., Van Raaphorst, W., Webster, I.,

- Marcin, J., Wiberg, P. y B. Sundby. 2001. Permeable marine sediments: Overturning an old paradigm. *Earth y Space Science News*, 82(11): 133-136.
- Bull, A. 2004. Microbial diversity and bioprospecting. Ed. ASM Press, E.U.A., 249 pp.
- Bull, A. Stach, J., Ward, A. y M. Goodfellow. 2005. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87: 65-79.
- Bull, A. y J. Stach. 2007. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Trends in Microbiology*, 15:491–499.
- Bunge, J., Willis, A. y F. Walsh. 2014. Estimating the number of species in microbial diversity studies. *Annual Review of Statistics and Its Application*, 1: 427-445.
- Cai, L., Ye, L., Yan, A., Lok, S. y T. Zhang. 2013. Biased Diversity Metrics Revealed by Bacterial 16S Pyrotags Derived from Different Primer Sets. *PLOS ONE*, 1: 1-11.
- Calva, L. y R. Torres. 2000. Distribución de carbohidratos, carbono y nitrógeno orgánico en sedimentos de tres lagunas del Golfo de México. *Hidrobiológica*, 10(2): 101-114.
- Cammen, L. 1982. Effect of particle size on organic content and microbial abundance within four marine sediments. *Marine Ecology Progress Series*, 9: 273-280.
- Caro-Quintero, A. y K. Konstantinidis. 2012. Bacterial species may exist, metagenomics reveal. *Environmental microbiology*, 14(2): 347-55.
- Chávez, J., Enríquez, M. y D. Aldana. 2014. Abundancia y diversidad larval de gasterópodos en el Caribe Mexicano en relación con la temperatura , la salinidad y el oxígeno disuelto. *Revista de Biología Tropical*, 62(3): 223-230.
- Chandrakant, S. y R. Shwetha. 2011. Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review. *Enzyme Research*, Vol. 2011.
- Chollet, I., Mumby, P., Müller-Karger, F. y C. Hu. 2012. Physucal environments of the Caribbean Sea. *Limnology and Oceanography*, 57(4): 1233-1244.

- Colquhoun J., Mexson J., Goodfellow M., Ward A., Horikoshi K. y A. Bull. 1998. Novel rhodococci and other mycolateactinomycetes from the deep sea. *Antonie van Leeuwenhoek*, 74: 27–40.
- Dai H., Wang J., Xin Y., Pei G., Tang S., Ren B., Ward A., Ruan J., Li W. y L. Zhang. 2010. *Verrucosipora sediminis* sp. nov., a cyclodipeptide-producing actinomycete from deep-sea sediment. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(8):1807-12.
- Deepa, S., Kanimozhi, K. y A. Pannerselvam. 2013. 16 rDNA Phylogenetic Analysis of Actinomycetes Isolated from Marine Environment Associated with Antimicrobial Activities. *Hygeia Journal for Drugs and Medicines*, 5(2): 43-50.
- Doyle L. y T. Sparks. 1979. Sediments of the Mississippi, Alabama, and Florida (MAFLA) continental shelf. *Journal of Sementary Petrology*, 50: 0905-0916.
- Duncan, K., Haltli, B., Gill, K. y R. Kerr. 2014. Bioprospecting from marine sediments of New Brunswick, Canada: Exploring the relationship between total bacterial diversity and actinobacteria diversity. *Marine drugs*, 12:899-925.
- Escobar, E. y F. García. 2009. Distribution of total organic carbon and total nitrogen in deep-sea sediments from the southwestern Gulf of México. *Boletín de la Sociedad Geológica Marina*, 61: 73-86.
- Fehling, R., Buchanan, G., Mincer, T., Kauffman, C., Jensen, P. y W. Fenical. 2003. Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. *Angewandte Chemie International Edition*, 42: 355–357.
- Fenchel, T. 2003. Biogeography for bacteria. *Science*, 301: 925-926.
- Fenchel, T. y B. Finlay. 2004. The ubiquity of small species: Patterns of local and global diversity. *BioScience*, 54: 777-784.
- Fenical, W., Baden, D., Burg, M., De Goyet, C., Grimes, J., Katz, M., Marcus, N., Pomponi, S., Rhines, P., Tester, P. y J. Vena. 1999. Marine-derived pharmaceuticals and related bioactive compounds. En: Fenical, W. (Ed),

- From Monsoons to Microbes: Understanding the Ocean's Role in Human Health. National Academic Press, 71-86 p.
- Fenical, W. y P. Jensen. 2006. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nature chemical biology*, 2(12): 666-73.
- Fenical, W., Jensen, P., Palladino, M., Lam, K., Lloyd, G. y B. Potts. 2009. Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). *Bioorganic y Medicinal Chemistry*, 17: 2175-2180.
- Freel, K., Millán-Aguiñaga, N. y P. Jensen. 2013. Multilocus sequence typing reveals evidence of homologous recombination linked to antibiotic resistance in the genus *Salinispora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(19): 5997-6005.
- Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S. y W. Li. 2012. CD-HIT: accelerated for clustering the next generation sequencing data. *Bioinformatics*, 28(23): 3150-3152.
- Goodfellow, M. y S. Williams. 1983. Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*, 37:189–216
- Goodfellow, M. y J. Haynes. 1984. Actinomycetes in marine sediments. En *Biological, Biochemical, and Biomedical Aspects of Actinomycetes*, Ortiz L., Bojalil, L. y Yakoleff, V. (Eds). Academic Press, E.U.A. 453-472 p.
- Gotelli, N. y R. Colwell. 2011. Estimating species richness. *Biological Diversity. Frontiers in Measurement and Assessment*, 2: 39-54.
- Graizbord, B., Palma, R., Mondragón, V., Chazaro, G. y U. Bando. 2009. Capítulo 4: Diagnóstico actual de la zona costera del Golfo de México. En: Friedman, J. *Adaptación a los impactos del cambio climático en los humedales costeros del Golfo de México (Vol. 1)*. México, DF. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Gülay, A. y B. Smets. 2015. An improved method to set significance thresholds for B diversity testing in microbial community comparison. *Environmental Microbiology*, 3: 342-349.
- Gulve, R., Deshmuk, A. y Sonajirao, K. 2012. Antimicrobial activity of the marine actinomycetes. *International Multidisciplinary Research Journal*, 2(3): 12-22.

- Hames, E. y A. Uzel. 2012. Isolation strategies of marine-derived actinomycetes from sponge and sediment samples. *Journal of Microbiological Methods*, 88: 342-347.
- Helmke, E. y H. Weyland. 1984. *Rhodococcus marinonascens* sp. Nov., an actinomycete from the sea. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34:127-138.
- Herrera-Silveira, J., Ramírez, J. y A. Zaldivar. 1998. Overview and characterization of the hydrology and primary producer communities of selected coastal lagoons of Yucatán, México, 1(3): 353-372.
- Herrera-Silveira, J. 2006. Lagunas costeras de Yucatán (SE, México): Investigación, diagnóstico y manejo. *Ecotrópicos*, 19(2): 94--108.
- Herrera-Silveira, J. y S. Morales-Ojeda. 2009. Evaluation of the health status of a coastal ecosystem in southeast Mexico: Assessment of water quality, phytoplankton and submerged aquatic vegetation. *Marine Pollution Bulletin*, 59: 72-86.
- Hughes, C., Prieto-Davó, A., Jensen, P. y W. Fenical. 2008. The marynopyrroles, antibiotics of an unprecedented structure class from a marine *Streptomyces* sp. *Journal of Organic Chemistry*, 10: 629-631.
- Jensen, P., Dwight, R. y W. Fenical. 1991. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 1102-1108.
- Jensen, P., Mincer, T., Williams, P. y W. Fenical. 2005a. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie Leeuwenhoek* 87:43–48.
- Jensen, P., Gontang, E., Mafnas, C., Micer, T. y W. Fenical. 2005b. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Applied Environmental Microbiology*, 71:1039–1048.
- Jensen, P., Williams, P., Oh, D., Zeigler, L. y W. Fenical. 2007. Species-specific secondary metabolite production in marine actinomycetes of the genus *Salinispora*. *Applied and environmental microbiology*, 73(4): 1146-52.
- Jensen, P. y F. Lauro. 2008. An assessment of actinobacterial diversity in the marine environment. *Antonie van Leeuwenhoek*, 94: 51-62.

- Kämpfer, P. 2012. Systematics of prokaryotes: The state of the art. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 101: 3-11.
- Karthik, L., Kumar, G. y K. Bhaskara-Rao. 2010. Diversity of marine actinomycetes from Nicobar marine sediments. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2(1): 199-203.
- Kerfahi, D., Hall-Spencer, J., Tripathi, B., Milazzo, M., Lee, J. y J. Adams. 2014. Shallow Water Marine Sediment Bacterial Community Shifts Along a Natural CO₂ Gradient in the Mediterranean Sea Off Vulcano, Italy. *Microbial Ecology*, 67: 819-828.
- Kim, M., Oh, H., Park, S. y J. Chun. 2014. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64: 346-351.
- Kjerfve, B., 1994. Coastal Oceanographic Characteristics: Cancun-Tulum Corridor, Quintana Roo. *Dinámica Hidrológica de Cenotes y Arrecifes, Estudio de Caracterización Económica y Criterios de Manejo y Zonificación de Usos del Suelo de 10 Megaproyectos Turísticos Mayaluum, Xaac, Xel-Ha y Desarrollo Ecológico Tulum*. EPOMEX, Final Report, 35p.
- Kokare, C., Mahadik, S., Kadam, S. y B. Chopade. 2004. Isolation of bioactive marine actinomycetes from sediments isolated from Goa and Maharashtra coastlines (west coast of India). *Indian Journal of Marine Sciences*, 33: 248-256.
- Kordel, W., Dasssenakis, M., Lintemann, J., Padberg, S., 1997, The importance of natural and organic material for environmental processes in water and soils, Technical report, International Union of Pure and Applied Chemistry, *Pure and Applied Chemistry*, 69, 1571-1600.
- Kouridaki, I., Polymenakou, P., Tselepides, A., Mandalakis, M. y S. Kenneth. 2010. Phylogenetic diversity of sediment bacteria from the deep Northeastern Pacific Ocean: Mediterranean Sea. *International Microbiology*, 13: 143-150.

- Kwon, H., Kauffman, C., Jensen, P. y W. Fenical. 2006. Marino- mycins A-D, antitumor-antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus "*Marinispora*". Journal of the American Chemical Society, 128:1622–1632.
- Lam, K. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. Current opinion in microbiology, 3: 245-251.
- Li, W. y A. Godzik. 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. Bioinformatics, 22: 1658-9.
- Li, J., Dong, J., Yang, J., Luo, X. y S. Zhang. 2014. Detection of polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase biosynthetic genes from antimicrobial coral-associated actinomycetes. Antonie van Leeuwenhoek, 106(4): 623-35.
- Lozupone, C. y R. Knight. 2005. UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. Applied and Environmental Microbiology, 71(12): 8228-8235.
- Lozupone, C., Hamady, M., Kelley, S. y R. Knight. 2007. Quantitative and qualitative ?? diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. Applied and Environmental Microbiology, 73(5): 1576-1585.
- Madigan, M., Martinko, J., y J. Parker. 2003. Brock: Biología de los Microorganismos (10^a ed). Pearson Education, Madrid. 1096pp.
- Magarvey, N., Keller, J., Bernan, V., Dworkin, M. y D. Sherman. 2004. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. Applied and Environmental Microbiology, 70: 7520-7529.
- Maldonado, L., Fenical, W., Jensen, P., Kauffman, C., Mincer, T., Ward, A., Bull, A. y M. Goodfellow. 2005a. *Salinisporaarenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinisporatropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55: 1759–1766.

- Maldonado, L., Stach, J., Pathom-aree, W., Ward, A., Bull, A. y M. Goodfellow. 2005b. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87: 11-18.
- Maldonado, L., Fragoso, D., Pérez, A., Rosellón, J. y E. Quintana. 2009. Actinobacterial diversity from marine sediments collected in México. *Antonie van Leeuwenhoek*, 95: 111-120.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J. y S. Kwon. 2013. Introduction to Marine Actinobacteria. En: Kwon, S. (Ed), *Marine Microbiology: Bioactive Compounds and Biotechnological Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH y Co. E.U.A. 1-19 p.
- Martin, G., Tan, L., Jensen, P., Dimayuga, R., Fairchild, C., Reventos, C. y W. Fenical. 2007. Marmycins A and B, Cytotoxic Pentacyclic C-Glycosides from a Marine Sediment-Derived Actinomycete Related to the Genus *Streptomyces*. *Journal of Natural Products*. 70(9): 1406-1409.
- McCarthy A. y S. Williams. 1992. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment: a review. *Gene*, 115:189–192.
- Merino, M. 1997. Upwelling on the Yucatan Shelf: Hydrographic evidence. *Journal of Marine Systems*, 13: 101-121.
- Mincer, T., Jensen, P., Kauffman, C. y W. Fenical. 2002. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 5005-5011.
- Mincer, T., Fenical, W. y P. Jensen. 2005. Culture-dependent and culture-independent diversity within the obligate marine actinomycete genus *Salinispora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 7019-7028.
- Moran, M., Rutherford, L. y R. Hodson. 1995. Evidence for indigenous *Streptomyces* populations in a marine environment determined with a 16S rRNA probe. *Applied and environmental microbiology*, 61(10): 3695-700.
- Murray, G. 2007. Constructing Paradise: The Impacts of Big Tourism in the Mexican Coastal Zone. *Coastal Management*, 35: 339-355.
- Nealson, K. 1997. Sediment bacteria: Who's there, What are they doing, and What's new? *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*. 25: 403-434.

- O'Malley, M. 2008. 'Everything is everywhere: but the environment selects': ubiquitous distribution and ecological determinism in microbial biogeography. *Studies in History and Philosophy of Science Part C : Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 39(3): 314-325.
- Ózcan, K., Aksoy, S., Kalkan, O., Uzel, A., Hames, E. y E. Bedir. 2013. Diversity and antibiotic-producing potential of cultivable marine-derived actinomycetes from coastal sediments of Turkey. *Journal of Soils and Sediments*, 13: 1493-1501.
- Papale, J., Kondas, A. y P. Leehan. 2012. Seasonal Shifts in Soil Bacterial Diversity in Southwestern Pennsylvania. *Proceedings of The National Conference On Undergraduate Research (NCUR) 2012 Weber State University, Ogden, Utah.*
- Patin, N., Kunin, V., Lidström, U. y M. Ashby. 2013. Effects of OTU Clustering and PCR Artifacts on Microbial Diversity Estimates. *Microbial Ecology*, 65: 709-719.
- Pisano M., Sommer M. y L. Brancaccio. 1989. Isolation of bioactive actinomycetes from marine sediments using rifampicin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31: 609–612.
- Power, E. 1995. Efficacy of the Ryu non-staining KOH technique for rapidly determining gram reactions of foodborne and waterborne bacteria and yeasts. *Applied Environmental Microbiology*, 61: 3756-3758.
- Prescott, L. 2002. *Microbiology*. 5ª Ed. McGraw-Hill, E.U.A. 1026 pp.
- Prieto-Davó, A., Fenical, W. y P. Jensen. 2008. Comparative actinomycete diversity in marine sediments. *Aquatic Microbial Ecology*, 52: 1-11.
- Prieto-Davó, A., Villarreal-Gómez, L., Forschner-Dancause, S., Bull, A., Stach, J., Smith, D., Rowley, D. y P. Jensen. 2013. Targeted search for actinomycetes from nearshore and deep-sea marine sediments. *FEMS: Microbial Ecology*, 1-9.

- Pruesse, E., Peplies, J. y F. Glöckner. 2012. SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics*, 28:1823-1829
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J. y F. Glöckner. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nuclei Acids Research*, 41(D1): D590-D596.
- Rashad, F., Fathy, H., El-Zayat, A. y A. Elghonaimy. 2015. Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial , nematocidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt. *Microbiological Research*, 175: 34-47.
- Rojas R., Narváez J., Zamudio M. y E. Mena. 2008. A Simple Silica-based Method for Metagenomic DNA Extraction from Soil and Sediments. *Molecular Biotechnology*. 40:13-17.
- Rosello-Mora, R. y R. Amann. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 14(2): 347-55.
- Rublee, P. y A. Dornseiff. 1978. Direct counts of bacteria on the sediments of a North Carolina salt marsh. *Estuaries*, 1: 188-191.
- Schloss, P., Westcott, S., Ryabin, T., Hall, J., Hartmann, M., Hollister, E., Lesniewski, R., Oakley, B., Parks, D., Robinson, C., Sahl, J., Stres, B., Thallinger, G., Van Horn, D. y C. Weber. 2009. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23): 7537-7541.
- Schloss, P y S. Westcott. 2011. Assessing and improving methods used in operational taxonomic unit-based approaches for 16S rRNA gene sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(10): 3219-3226.
- Sirivasan, M., Laxman, R. y M. Desphande. 1991. Physiology and nutrition aspects of Actinomycetes – An overview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 7:171-184.

- Solano, G., Rojas-Jiménez, K., Jaspars, M. y G. Tamayo-Castillo. 2009. Study of the diversity of culturable actinomycetes in the North Pacific and Caribbean coasts of Costa Rica. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 1:71-78.
- Stach, J., Maldonado, L., Masson, D., Ward, A., Goodfellow, M. y A. Bull. 2003. Statistical approaches to estimating bacterial diversity in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10): 6189-6200.
- Stach, J. y A. Bull. 2005. Estimating and comparing the diversity of marine actinobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87(1): 3-9.
- Stackebrandt, E. y B. Goebel. 1994. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(4): 846-849.
- Stackebrandt, E., Rainey, F. y N. Ward-Rainey. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47:479–491.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., FilipSKI, A. y S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- Tanasupawat S., Jongrungruangchok S. y T. Kudo. 2010. *Micromonospora marina* sp. nov., isolated from sea sand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(3):648-52.
- Tarbutk, E. y F. Lutgens. 2005. *Ciencias de la Tierra. Una introducción a la Geología Física*". Pearson-Prentice Hall, 8ª ed. España, 578 pp.
- Teske, A. 2013. Marine Deep Sediment Microbial Communities. En: Rosenberg, E., DeLong, E., Lory, E. y F. Thompson. *The Prokaryotes Prokaryotic Communities and Ecophysiology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Tian, X., Long, L., Wang, F., Xu, F., Li, J., Zhang, J., Zhang, C., Zhang, S. y W. Li. 2012. *Streptomyces nanhaiensis* sp. nov., a marine streptomycete isolated from a deep-sea sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(4): 864-868.

- Tiwari, K. y R. Gupta. 2012. rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(2): 108-132.
- Torres-Beltrán, M., Cardoso-Martínez, F., Millán-Aguiñaga, N., Becerril-Espinosa, A. e I.E. Soria-Mercado. 2012. Evaluation of the Gulf of California as a potential source of bioactive marine actinobacteria. *Ciencias Marinas*, 38(4): 609-624.
- Valdes, D. y E. Real. 2004. Nitrogen and phosphorus in water and sediments at Ria Lagartos coastal lagoon , Yucatan , Gulf of Mexico. *Indian Journal of Marine Sciences*, 33(4): 338-345.
- Villegas-Sánchez, C., Lara-Arenas, J., Catro-Pérez, J. y J. Arias-González. 2015. Patrones de reclutamiento de 4 especies ícticas en hábitats de parche y cordillera del arrecife Banco Chinchorro (Caribe mexicano). *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82(2): 396-405.
- Vos, M. 2011. A species concept for bacteria based on adaptive divergence. *Trends in microbiology*, 19(1): 1-7.
- Ward, A. y N. Bora. 2006. Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Current opinion in microbiology*, 9: 279-286.
- Weyland, H. 1969. Actinomycetes in North Sea and Atlantic Ocean sediments. *Nature*, 23: 858.
- Weyland H. 1981. Distribution of actinomycetes on the sea floor. *Zentral Bakteriologie*, suppl. 11: 185-193.
- Williams, P. 2008. Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. *Trends in Biotechnology*, 27:45-52.
- Wintzingerode, F., Göbel, U. y E. Stackebrandt. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: Pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 21(3): 213-229.
- Zhang, S., Zhang, C., Tian, X., Wang, F. y J. Li. 2010. The Study of Diversities of Marine Microbes in China. *Bulletin of the Chinese Academy of Sciences*, 24(4): 228-234.

Zhang, S., Ye, L., y X. Tang. 2011. Diversity and bioactivity of actinomycetes from marine sediments of the Yellow Sea. *Journal of Ocean University of China*, 11(1): 56-64.