



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



**ACTINOBACTERIAS BIOACTIVAS DEL GOLFO DE CALIFORNIA:
ABUNDANCIA Y ASPECTOS ECOLÓGICOS**

TESIS

Que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias en Oceanografía Costera

Presenta

OC. MÓNICA TORRES BELTRÁN

Ensenada, Baja California, México.

Noviembre 2009.



FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



MAESTRÍA EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

**ACTINOBACTERIAS BIOACTIVAS DEL GOLFO DE CALIFORNIA:
ABUNDANCIA Y ASPECTOS ECOLÓGICOS**

TESIS

Que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios
para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

presenta

Oc. MÓNICA TORRES BELTRÁN

Aprobado por:

Dra. Irma E. Soria Mercado
Directora de Tesis

Dr. Ramón Cajal Medrano
Sinodal

M. en C. Ana María Iñiguez Martínez
Sinodal

RESUMEN

Las actinobacterias son un grupo de bacterias Gram-positivas productoras de diversos compuestos bioactivos utilizados actualmente como antibióticos y agentes citotóxicos. El sedimento marino se ha convertido en una fuente potencial para el aislamiento de actinobacterias productoras de importantes compuestos bioactivos como el Salinosporamide A obtenido a partir de *Salinispora tropica* aislada de sedimentos del Golfo de California. A pesar de su importancia biotecnológica se sabe poco respecto a la ecología de estos microorganismos lo cual dificulta su recuperación y cultivo. Con base en lo anterior los objetivos de este trabajo fueron estimar la abundancia de cepas de actinobacterias cultivables bioactivas aisladas de sedimentos del Golfo de California y evaluar su eficiencia de crecimiento en condiciones de cultivo. Se obtuvieron 235 cepas de actinobacterias, clasificadas por su morfología y requerimientos de crecimiento del tipo *Streptomyces*, *Micromonospora* y *Salinispora*. Se obtuvieron los extractos orgánicos de 48 cepas pertenecientes al tipo *Micromonospora* y *Salinispora*, de las cuales 16 en su fracción no polar presentaron actividad citotóxica contra las líneas celulares de cáncer de mama (MCF7) y cérvix (HeLa). Los valores de actividad más altos observados fueron del 20% contra MCF7 por las cepas S-365 y S-355, 24% contra HeLa por la cepa S-165 y 25% contra MCF7 (S-361) y HeLa (S-361 y S-353). Sólo 3 de éstos en su fracción polar mostraron actividad antibiótica contra el patógeno *Staphylococcus aureus* resistente a metacilina (MRSA) con valores de actividad de 3 y 6% por las cepas S-370 y S-369, respectivamente. Los valores estimados para la tasa de crecimiento específica fueron de 0.207- 0.289 d⁻¹ de acuerdo a los resultados de cuantificación de proteínas y volumen celular empacado, respectivamente. Los valores de tiempo de duplicación calculados fueron de 2.3 y 3.3 días con base en la cuantificación de proteínas y volumen celular empacado, respectivamente. Con base en los valores de tasa de crecimiento específica y tiempo de duplicación reportados, se considera que las actinobacterias son microorganismos de crecimiento lento. Su estrategia y velocidad de crecimiento pueden ser características que permitan explicar su potencial actividad biológica.

ABSTRACT

The actinobacteria are a group of Gram-positive bacteria producers of many bioactive compounds utilized nowadays as antibiotics and anticancer drugs. The marine sediment has become a novel and potential source for the isolation of actinobacteria, it has allowed the obtention of strong anticancer compounds as Salinosporamide A produced by the actinobacteria *Salinispora tropica* isolated from The Gulf of California. Although their biotechnological importance less is known about the ecology which makes difficult their recovery and culture under laboratory conditions. The main objective of this project was to estimate the abundance of cultivable bioactive actinobacteria strains isolated from Gulf of California marine sediment and to evaluate their growth efficiency under laboratory culture conditions. In this study 235 actinobacteria-like strains were isolated and classified by their morphology and growth requirements as *Streptomyces*- like, *Micromonospora*- like and *Salinispora*- like strains. Forty eight organic extracts were obtained from *Micromonospora* and *Salinispora*-like strains. Sixteen nonpolar extracts showed cytotoxic activity against breast cancer cells (MCF7) and cervical cancer cells (HeLa). The highest activity values observed were 20% - 25% against MCF7 cells (S-365, S-355 and S-361 strains), 24% - 25% for HeLa cells (S-361 and S-353). Only three polar extracts showed antibiotic activity toward methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with activity values of 3 and 6% (S-370 and S-369 strains). Specific growth rate values of 0.207 and 0.289 d⁻¹ were obtained based on the protein quantification and packed cell volume results, respectively. The generation times calculated were of 2.3 to 3.3 days according with protein and packed cell volume variations. Based on the specific growth rate and generation times values, is possible to consider that actinobacteria are slow growth bacteria. Their growth strategy and speed could be characteristics that allow us to explain the biological activity potential of this bacterial group.

DEDICATORIA

A mi querido abuelo, mi " abolo "
Don César Beltrán
" No hace falta tener las dos piernas para llegar lejos,
sólo se necesita el corazón "

A mis tres grandes héroes:

Mi mamita querida "Pisita", la mujer más grande del mundo
Mi hermano "Pacho", corazón de león
Mi hermanita "Karita", alegría del alma

Al amor de mi vida:

Mi "hubito"

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Irma E. Soria Mercado, mi directora de tesis, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, su apoyo en la realización de este trabajo y por su amistad y confianza en estos años.

Al Dr. Ramón Cajal Medrano, por su apoyo e ideas en la realización de esta tesis. Por ser mi maestro y mostrarme una nueva perspectiva y visión para mi futuro académico.

A la M. en C. Ana María Iñiguez, por su apoyo, entusiasmo y colaboración en la realización de mi tesis.

Al Dr. Farooq Azam, por permitirme vivir la gran experiencia de trabajar en su laboratorio. Por compartir conmigo su conocimiento y darme la oportunidad de experimentar para encontrar mi verdadera pregunta.

Al Dr. Paul Jensen, por su confianza y permitirme trabajar en su laboratorio. Gracias por escuchar mis ideas.

Al Dr. Alexei Licea por permitirnos trabajar en su laboratorio y brindarnos el material necesario para la realización de los bioensayos.

A mi querida mamita Elia Beltrán Guerrero, por ser mi maestra de toda la vida. Porque gracias a ti soy todo lo que soy y tengo todo lo que tengo. Por enseñarme que la vida es bella por su gama de colores, a seguir siempre adelante, por enseñarme a sonreír ante cualquier adversidad y ser FELIZ. Por ser mi mejor y más grande amiga, por tener siempre la palabra exacta en el instante preciso. Por todo tu esfuerzo y gran ejemplo. Te amo con todo mi corazón... E' per te la certezza, la forza, la dolcezza, E' per te ogni cosa che c'...

A mis queridos hermanitos, Paco y Kary. Por ser el mejor ejemplo de fortaleza y grandeza. Por ser seres tan únicos y maravillosos. Por a pesar de todo siempre hacerme reír y hacerme dar cuenta de que la vida se trata de tropezarse, sacudirse y seguir disfrutando del paseo. Los adoro con todo mi corazón, son mi más grande orgullo.

A mi querido abuelo, te me fuiste antes de tiempo mi querido viejo. Por siempre creer en mí y quererme tanto. Por darme la más grande lección de vida en vida, por nunca darte por vencido, por tu buen humor sin importar el mal tiempo. Por tu apoyo y compañía de toda la vida. Por ser mi mejor y gran amigo. Por las grandes aventuras que vivimos juntos y las que nos quedan por vivir. Siempre te llevo en mi corazón.

A mi amado Boo/ Dude/ Hubi... a te che sei, semplicemente sei compagna dei gioni miei, sostanza dei sogni miei, ate che sei esencialmente sei, il mio amore grande, il mio grande amore... Por ser mi mejor amigo, compañero y amor de mi vida, maestro, hermano, novio, mi TODO. Por todo tu apoyo, comprensión y amor a

pesar de los años y circunstancias. Por tener fé y confianza en mí. Por ser la mejor razón para seguir adelante. Gracias por cada instante... nuestra aventura a penas comienza... and I'm still falling... Come what may, I will LOVE YOU.

A mi maravillosa familia. Gracias por su apoyo y entusiasmo a lo largo de todas las aventuras de mi vida. Por siempre estar dispuestos a brindarme lo mejor de ustedes, por sus palabras y sonrisas. Gracias tío Iván "Enano", tía Sandy "oyes", tía Sele, tío Pedro, tío César, a las nenas de la familia Pame e Ivy, por complementar mi vida de la manera más maravillosa. Los quiero mucho.

A la familia Malpica Cruz. Por su apoyo y cariño a lo largo de los años, y por permitirme compartir con ustedes tantos bellos momentos.

A mis amigos y amigas, compañeros y compañeras de la carrera, Esther, Maggie, Estrella, Disraely, Gustavo, Marco, Pablo, y maestría que han formado parte de mi vida y mi formación. Gracias por los momentos compartidos a lo largo de estos años.

A mi gran equipo: Anahí Silva por tu optimismo y entusiasmo, Violeta Fernández por tu apoyo "todo se puede aunque sea difícil", Dense Lubinsky por tu comprensión, Nelva Victoria por las pláticas de filosofía. Gracias por las grandes aventuras y por TODO!! Sin ustedes simplemente este paso no hubiera sido un viaje mágico místico y maravilloso, los quiero mucho.

A mi -muy mejor amiga- Natalie Millán Aguiñaga. Por tu apoyo, comprensión y amistad. Por todas las risas, lágrimas, molestias, decepciones, los enojos y maldiciones, por los buenos y malos ratos, por escucharme y tu confianza. Gracias por a pesar de la distancia seguir estando cerca en todo momento. Por haber vivido a mi lado las mejores y peores etapas de mi vida. Gracias por TODO! Te quiero mucho.

A mi querida amiga y maestra Faviola Martínez Cardoso. Por tu gran ayuda y guía en la realización de este trabajo. Por escucharme y siempre darme ánimo para seguir echándole ganas en los momentos difíciles de este camino. Por compartir conmigo buenos y malos momentos no sólo en el laboratorio, sino en el transcurso de mi vida personal.

A la familia Millán Aguinaga, por su amistad a lo largo de mi estancia en este lugar. Por brindarme la oportunidad de compartir con ustedes grandes momentos.

A todos los integrantes del laboratorio de Ecología Pesquera y otros laboratorios de CICESE. A la Dra. Herska y Dr. Sosa por "adoptarme". En especial a Yorch, José, Bertha, Ane, Karis, César, Micks y Mary, por compartir conmigo aventuras y brindarme su amistad.

A mi hermanito Richard, por ser una de las personas más geniales que he conocido. Por ser el mejor hermano mayor del mundo. Por siempre estar ahí sin importar todas las barreras. Por su cariño y amistad, por su comprensión y lealtad,

por siempre tener una sonrisa, lágrima, abrazo, palabra y galleta que compartir. Eres una de mis personas favoritas en el mundo! Te quiero mucho... Life is good!

A mi querido amigo Poncho, por tu apoyo en los últimos pasos de mi vida.

A mis queridos maestros del "arte", Omar y Jushiro. Por los grandes momentos compartidos en el agua, gracias por enseñarme una nueva filosofía de vida... Let there be waves!

A la Facultad de Ciencias Marinas por todo el apoyo brindado a lo largo de mi formación académica. A mis maravillosos maestros de la universidad gracias por todas sus enseñanzas, en especial a la Dra. Roxana Rico mi maestra de microbiología por su ejemplo. Gracias a Angélica, Lorena, Yoli, Evelia, Arturo, Epimenio y Manuel, por su ayuda y apoyo de tantos años.

A CONACYT por la beca otorgada (núm. 224262) sin la cual la realización de esta tesis maestría no hubiera sido posible.

Nota para el lector:

En el proceso de la realización de este trabajo me di cuenta de varias cosas que me gustaría compartir contigo. Independientemente de la etapa de formación en la que estés te sugiero no olvidar o considerar lo siguiente. El camino para lograr alcanzar tus objetivos en la vida (personales y/o profesionales) no es sencillo, requiere de constancia, dedicación y mucho esfuerzo, pero sobre todo una buena actitud ante la vida. Habrá momentos en los que todo este contra tuya, y es precisamente en estos momentos cuando debes estar más concentrado en no perder de vista tu objetivos, como dirían los vecinos del norte "stay focus". Respira profundo y adelante, no importa que suceda sigue adelante siempre adelante. Considérate privilegiado de tener la oportunidad de recibir una educación de nivel superior, aprovéchala. Date el tiempo de hacer las cosas bien, de equivocarte y experimentar contigo mismo, disfrútalo. Vive, aprende y aférrate a cada día. Y recuerda, Smile... Life is good! =)

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVO GENERAL	11
2.1 Objetivos particulares	11
III. METODOLOGÍA	12
3.1 Área de Estudio	12
3.2 Desarrollo experimental	14
3.2.1 Colecta y pre- tratamiento de muestras	14
3.2.2 Cultivo y aislamiento de actinobacterias	15
3.2.3 Prueba de requerimiento de agua de mar	17
3.2.4 Criopreservado de cepas	17
3.2.5 Extracción de compuestos	18
3.2.6 Pruebas de actividad	19
i. Actividad citotóxica	19
ii. Actividad antibiótica	21
3.2.7 Ensayo de Incorporación de 3H- Leucina	22
3.2.8 Cuantificación de proteínas bacterianas	24
3.2.9 Cuantificación de DNA bacteriano	26
3.2.10 Volumen celular empacado (PCV)	28
3.2.11 Determinación de Peso seco	30
IV. RESULTADOS	31
4.1 Abundancia de actinobacterias	31
4.2 Pruebas de actividad	35
4.2.1 Actividad citotóxica	36
4.2.2 Actividad antibiótica	39
4.3 Ensayo de Incorporación de 3H- Leucina	42
4.4 Cuantificación de proteínas y DNA	45
4.5 Volumen celular empacado (PCV)	48

V. DISCUSIÓN	53
5.1 Abundancia de actinobacterias	53
5.2 Actividad biológica	63
5.3 Evaluación de crecimiento	71
5.4 Discusión general	79
VI. CONCLUSIONES	83
VII. REFERENCIAS	86

ÍNDICE DE FIGURAS

1.	Áreas de colecta de muestras de sedimento.....	14
2.	Abundancia de las cepas de actinobacterias tipo <i>Streptomyces</i>	32
3.	Abundancia de las cepas de actinobacterias tipo <i>Micromonospora</i>	32
4.	Histograma del número total de cepas obtenidas de los diferentes medios de cultivo.....	35
5.	Histograma de la incorporación total de ^3H -Leucina en $\text{mol Leu L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y producción bacteriana total en $\text{KgC L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para los diferentes tiempos de incubación de la cepa de actinobacteria S-178.....	45
6.	Variación en la concentración de proteínas y DNA en función al tiempo de incubación del cultivo bacteriano.....	47
7.	Variación en el volumen celular empacado (PCV) expresado en μL con respecto al tiempo de incubación del cultivo bacteriano (días).....	50
8.	Variación en la concentración celular (número de células por mililitro) en función al tiempo de incubación del cultivo de la cepa S-178	52

ÍNDICE DE TABLAS

I.	Resultados de actividad citotóxica de los extractos crudos en su fracción no polar de las cepas tipo <i>Micromonospora</i>	40
II.	Valores de actividad antibiótica de los extractos crudos en su fracción polar contra los diferentes patógenos probados.....	41
III.	Cálculos de incorporación de ³ H- Leucina, producción Bacteriana (PB), tasa específica de crecimiento (μ) y tiempo de generación (g) para la cepa de actinobacteria S-178.....	43

INTRODUCCIÓN

El hábitat marino es un medio que permite la proliferación de la vida a todas las escalas, particularmente de los microbios o bacterias. Estos microorganismos se encuentran en toda la extensión de la columna de agua, desde la superficie hasta zonas abisales. Habitan en zonas costeras u oceánicas e incluso se pueden encontrar en sistemas tan opuestos como los arrecifes de coral y las chimeneas hidrotermales. Son de gran importancia para este medio ya que su actividad metabólica permite la degradación y remineralización de material orgánico en los sedimentos y la columna de agua (Surajit-Das *et al.*, 2006).

El medio ambiente marino está caracterizado por parámetros hostiles como una alta presión, salinidad, baja temperatura, escasez de luz, etc. Sin embargo, las bacterias marinas presentan adaptaciones que les han permitido sobrevivir en este ambiente, como son el requerimiento del ión sodio para crecer y mantener el equilibrio osmótico con su ambiente. Además son capaces de desarrollarse aún en condiciones oligotróficas (Surajit-Das *et al.*, 2006).

La distribución de estos microorganismos depende o varía en función de los factores fisicoquímicos antes mencionados. (Surajit-Das *et al.*, 2006). Por ejemplo, la temperatura es de gran importancia para el crecimiento bacteriano y la actividad metabólica de estos microorganismos. El efecto de la variación de la temperatura puede ser un factor de estrés en la población el cual puede promover la competencia de distintos grupos de una misma comunidad bacteriana. Por su parte, el pH es el factor clave que determina la competencia

entre bacterias, puede llegar a definir la sucesión y proliferación de éstas. Su adaptación a los cambios de pH, les permite mantener su actividad metabólica y asegurar su persistencia en el medio (Vernam y Evans, 2000).

La competencia entre bacterias, implica que tan eficaz es la respuesta de un microorganismo ante distintos factores de estrés respecto a la de otro, y cómo es que el primero se puede beneficiar con la respuesta del segundo. En ambientes como los sedimentos, que tienen la capacidad de soportar una numerosa población de microorganismos, la estrategia competitiva más común es la combativa. Ésta ocurre principalmente por la necesidad de nutrientes y consiste en la producción de sustancias antagonistas específicas para otros microorganismos, como los antibióticos (bacteriostáticos y bactericidas) (Vernam y Evans, 2000).

Estas sustancias antagonistas son denominadas metabolitos secundarios, los cuales se caracterizan por tener una estructura química compleja y se producen durante la idiofase (fase de producción de metabolitos secundarios) del crecimiento bacteriano. Los compuestos obtenidos a partir de bacterias marinas, han resultado altamente eficaces contra distintos agentes patógenos que afectan a los humanos. Por esta razón, surgió el área de investigación de la farmacología aplicada en la bacteriología marina, con el propósito del descubrimiento de estas sustancias activas (Surajit-Das *et al.*, 2006).

Dentro de las bacterias marinas que han demostrado ser productoras de compuestos bioactivos se encuentran los actinomicetos o actinobacterias. Éstos

pertenecen al orden Actinomicetales y se caracterizan por ser bacterias Gram-positivas con ramificaciones filamentosas.

Son un grupo muy exitoso y ampliamente distribuido ya que tienen un gran número de propiedades que les favorecen en la competencia con otros organismos saprofiticos. Producen diferentes tipos de esporas que les sirven como agentes de dispersión y sobrevivencia, la mayoría tiene la capacidad de formar un micelio radial el cual les facilita la colonización de sustratos lejanos al centro de crecimiento (Prieto-Davó *et al.*, 2008). Estas características les aseguran la supervivencia bajo condiciones ambientales poco favorables (Maier *et al.*, 2000). Habitan por lo general en la zona aeróbica de los sedimentos, donde contribuyen al proceso de degradación y reciclaje de nutrientes. Se ha reportado que existen más de un millón de células por gramo de sedimento. (Prieto-Davó, 2002).

A pesar de los reportes existentes de la diversidad de actinobacterias en el ambiente marino, existe una incertidumbre respecto a su estatus "autóctono" en este medio ambiente (Bull *et al.*, 2005). Se cree que las esporas de las actinobacterias marinas derivan de los terrestres y que sus esporas fueron transportadas de la superficie de los continentes hacia al mar. En el medio marino éstas pudieron permanecer en forma latente por un largo periodo de tiempo, adaptándose fisiológicamente para ser biológicamente activas en el océano. De esta manera, es posible que surgiera un gran reservorio de nuevos taxa de actinobacterias (Mincer *et al.*, 2002; Bull *et al.*, 2005).

Para poder establecer un criterio que defina si un organismo es o no autóctono del medio marino, se deben considerar los siguientes aspectos: la capacidad de tener un crecimiento óptimo a la salinidad *in situ*, presión, temperatura y concentración de nutrientes. Así como demostrar actividad metabólica bajo las condiciones *in situ* antes mencionadas. Las actinobacterias que cumplan con estos requisitos, se pueden considerar propios del medio ambiente marino (Bull *et al.*, 2005).

Las actinobacterias pueden llegar a ser hasta el 10% del total de bacterias en una comunidad microbiana del sedimento marino. En este medio se les ha conferido el papel ecológico de biodegradadores de la materia orgánica. Sin embargo, esta premisa no se ha comprobado y está fundamentada en el siguiente argumento. Los sedimentos del fondo marino son una fuente de carbono orgánico disuelto, conocido como materia orgánica (COD refractario), el cual necesita ser constantemente movilizado al igual que la porción particulada. Quienes se encargan de mantener esta materia orgánica en circulación son las bacterias marinas, incluyendo las actinobacterias (Bull *et al.*, 2005).

Sin embargo, al encontrarse en menor número que otros grupos en un medio en donde existe una alta competencia por la obtención de nutrientes, probablemente se ven obligadas a desarrollar una actividad antagonista (producción de compuestos bioactivos) para asegurar su sobrevivencia en el medio (Grossart *et al.*, 2004).

Se considera que aproximadamente dos tercios de los antibióticos que actualmente se utilizan, fueron descubiertos como productos fermentativos de actinobacterias. Ejemplo de estos antibióticos son: la estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol y eritromicina, aislados de distintas especies de *Streptomyces* (Magarvey *et al*, 2004). Otros metabolitos secundarios bioactivos aislados a partir de actinobacterias marinas, son antitumorales e inmunosupresores (Mincer *et al*, 2002).

Debido a la urgente necesidad de encontrar nuevas sustancias activas contra el gran número de agentes patógenos resistentes a los medicamentos actuales, la industria farmacéutica ha realizado una búsqueda intensiva de estos microorganismos por más de 50 años (Fenical y Jensen, 2006). La búsqueda de estos microorganismos en ambientes no explorados, tiene la finalidad principal de encontrar nuevos compuestos bioactivos, útiles para la salud humana (Jensen *et al.*, 2005).

Recientemente el sedimento marino ha resultado una fuente potencial para el aislamiento de distintos representantes de actinobacterias bioactivas (Maldonado *et al.*, 2005). Dentro de los grupos aislados, se reconocen dos familias con la mayor cantidad de producción de metabolitos secundarios, Streptomycetaceae y Micromonosporaceae (Magarvey *et al*, 2004). Estudios reportan que dentro de la familia Micromonosporaceae, se encuentra la primera actinobacteria marina obligada. Ésta es halófila, exclusiva de sedimentos marinos y pertenece al género *Salinispora* (Mincer *et al*, 2002).

De este género se tiene la descripción completa y detallada de dos especies marinas, *Salinispora arenicola* y *Salinispora tropica*, y existe una tercera la cual se ha propuesto nombrar como "*S. pacifica*" (Fenical y Jensen, 2006). Actualmente se han cultivado más de 100 cepas de *Salinispora* spp., más del 80% de éstas han mostrado tener el potencial de inhibir el crecimiento de células tumorales, y un 35% tienen actividad antibiótica contra distintos patógenos que afectan a los humanos (Fenical y Jensen, 2006).

En el 2003 se obtuvo la extracción de un compuesto anticancerígeno muy potente llamado Salinosporamide A de *S.tropica*. Este compuesto es utilizado actualmente en la industria farmacéutica en pruebas clínicas para el tratamiento contra diferentes tipos de melanoma. Además en experimentos *in vivo*, ha mostrado actividad contra tumores humanos en modelos de ratón (Maldonado *et al.*, 2005; Fenical y Jensen, 2006).

Salinosporamide A, es una β -lactona- γ -lactama que contiene un átomo de cloro y que tiene actividad inhibitoria del proteosoma 20S que induce la apoptosis de las células múltiples de melanoma (Feling *et al.*, 2003). Otro compuesto derivado de actinobacterias con actividad biológica es el diazenopinomicin, que es una dibenzodiazepinona, producida por una cepa de *Micromonospora*. Este compuesto presenta actividad antibacteriana, antiinflamatoria y antitumoral, así como una citotoxicidad *in vitro* muy amplia. Estudios *in vivo* han demostrado que tiene actividad contra cáncer de próstata y de mama en modelos de ratón (Charan *et al.*, 2004).

Un gran número de cepas del genero *Salinispora* han sido obtenidas de sedimentos del Atlántico subtropical, el Mar Mediterráneo y el Mar de Cortés, lo cual sugiere una distribución pan-tropical de estos microorganismos (Jensen *et al.*, 2005 ; Maldonado *et al.*, 2005_{b,c}). A pesar de que representantes de este género han sido aislados del Mar de Cortés, no se ha realizado un estudio extenso a lo largo del Golfo de California para su diagnóstico como una posible fuente de nuevas cepas bacterianas bioactivas.

Debido a la importancia biotecnológica de las actinobacterias, es importante conocer respecto a la diversidad, la ecología, y condiciones en las que producen metabolitos secundarios (Maldonado *et al.*, 2005). Una hipótesis se basa en que la producción está ligada al proceso de esporulación y ocurre en condiciones limitadas de nutrientes, por ello, un metabolito secundario con actividad antibiótica garantiza la no proliferación de otros microorganismos. Esta ventaja permitiría llevar a cabo el proceso de esporulación y por lo tanto de aumentar las posibilidades de supervivencia. Otros autores sugieren que los metabolitos secundarios son sólo desechos orgánicos del metabolismo primario del microorganismo (Agogué *et al.*, 2005).

Con el propósito de obtener una mejor estimación de la diversidad de las actinobacterias marinos bioactivos, es indispensable el uso de medios de cultivo y técnicas de aislamiento selectivos. Los medios de cultivo selectivos para este tipo de bacterias, se caracterizan por contener antibióticos y fungicidas, que evitan el crecimiento de otras bacterias (Gram-positivas y negativas) y hongos con mayores tasas de crecimiento que las actinobacterias (Prieto-Davó, 2002).

De manera general el antibiótico más utilizado en los medios de cultivo para actinobacterias es la rifampicina a una concentración de 5µg/ml y ciclohexamida como fungicida. Para aumentar el porcentaje de recuperación de actinobacterias, se lleva a cabo una técnica de estrés térmico. Esta técnica elimina a todas las demás bacterias presentes en la muestra que no son resistentes a temperaturas mayores a los 50° C y que no forman esporas bajo estas condiciones. Sin embargo, bajo estas condiciones se favorece la formación de esporas de las actinobacterias y de esta manera se facilita su cultivo (Prieto-Davó, 2002).

Experimentalmente se ha observado un mejor crecimiento de estos microorganismos en medios con baja concentración de nutrientes. Algunos de los medios de cultivo utilizados con más frecuencia para la obtención de este tipo de microorganismos tienen como ingredientes lo siguiente: agar como gelificante, una mezcla de manitol, peptona, y novobiocina como antibiótico en diferente proporción y su respectivo agente fungicida (Jensen *et al.*, 2005). Sin embargo, los requerimientos para su óptimo crecimiento aún no han sido evaluados y especificados, lo cual dificulta su recuperación y cultivo en el laboratorio (Prieto-Davó, 2002; Fenical y Jensen, 2006).

El estudio de las actinobacterias marinas es relativamente reciente y se ha enfocado principalmente a la explotación de los recursos biotecnológicos que proveen estos microorganismos a la industria farmacéutica. Sin embargo, el estudio de su ecología, el implemento de nuevas técnicas de recuperación y

cultivo, además del uso de las técnicas moleculares (cultivo-independientes), permitirá ampliar el conocimiento de este grupo de bacterias para su adecuado aprovechamiento biotecnológico.

La biomasa y la tasa de crecimiento son características básicas que definen la importancia de un organismo en el ambiente. El desarrollo de métodos reproducibles que permitan medir estas propiedades de los grupos bacterianos es un objetivo importante para la ecología microbiana (Baath, 1993).

Desde un punto de vista químico, la cinética de crecimiento (curvas de crecimiento) de los cultivos microbianos es importante cuando se tiene como objetivo final obtener un producto de la fermentación del cultivo. Conocer la evolución de un cultivo microbiano permite predecir como se van a ir consumiendo los nutrientes del sustrato y como se va a ir acumulando el producto de la fermentación (Tibbles, 1996).

Cualquiera que sea el enfoque del estudio conocer las características básicas del microorganismo con el que se está trabajando permite un mejor manejo de éste como la herramienta que nos permitirá explicar un proceso.

Una forma de medir tasas de crecimiento y actividad bacteriana en ambientes naturales es con el uso de la incorporación de ^3H -Leucina (Leu) y ^3H -Timidina (TdR). La incorporación de TdR es utilizada como indicador de la división celular y síntesis de DNA, mientras que la incorporación de Leu permite estimar las tasas de producción de proteínas (Church *et al.*, 2000). Por medio de estas técnicas es posible hacer mediciones de las tasas de utilización de

sustratos, productividad y crecimiento, que pueden reflejar la actividad *in situ* de un grupo bacteriano como las actinobacterias (Bull *et al.*, 2005).

Por su crecimiento en colonias formadoras de micelios o matrices filamentosas, el uso de técnicas convencionales como densidad óptica (DO) o conteo directo por microscopia de epifluorescencia no es factible para este grupo de microorganismos. El uso de técnicas alternativas como la cuantificación de proteínas, DNA y volumen celular empacado, permiten la elaboración de curvas que reflejen el cambio en la concentración de las variables durante el periodo de cultivo.

El incremento en la concentración de cualquiera de las variables antes mencionadas se considera proporcional al aumento en el número de células en un cultivo microbiano. La representación gráfica de estos cambios da a lugar a la obtención de una curva de crecimiento.

El desarrollo y estandarización de técnicas que permitan describir el crecimiento de las actinobacterias bajo condiciones de cultivo, será de gran utilidad para la comprensión de este grupo bacteriano desde el punto de vista ecológico y su aprovechamiento biotecnológico.

OBJETIVO GENERAL

Estimar la abundancia de actinobacterias cultivables bioactivas presentes en los sedimentos de Bahía Concepción, B. C. S. y Bahía de los Ángeles, B. C., México.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar, purificar y criopreservar las cepas de actinobacterias recuperadas de los sedimentos de Bahía Concepción y Bahía de los Ángeles.
2. Realizar los bioensayos de actividad antibiótica y citotóxica con los extractos (100mL) crudos de las cepas puras de actinobacterias.
3. Estimar la tasa de crecimiento, tiempo de generación y productividad bacteriana de las cepas de actinobacterias aisladas.

METODOLOGÍA

ÁREA DE ESTUDIO

El Golfo de California es una extensión del Océano Pacífico, que se ubica entre la Península de Baja California y los estados de Sonora y Sinaloa, al noroeste de México. Tiene una longitud de 1203 kilómetros (km) y su anchura varía entre los 92 y 222 km. Es un mar semicerrado y subtropical, caracterizado por un fuerte gradiente lateral de productividad biológica de baja a moderada en el sureste y con niveles altos en el centro y noroeste. La fertilidad de sus aguas mantiene una amplia diversidad de flora y fauna marina. Sus recursos pesqueros y su potencial turístico lo convierten en una región económica y comercialmente importante para el país (Cervantes-Duarte *et al*, 2000).

Por sus características, el Golfo de California resulta un sitio idóneo para la búsqueda de nuevas especies de actinobacterias.

Bahía Concepción está localizada en la costa noreste de Baja California Sur (Fig.1). Su comunicación con el Golfo de California se encuentra en el extremo norte y es permanente. Su profundidad media es de 17m y la máxima de 30 m (Espinosa-Villegas, 1999).

La temperatura superficial del agua oscila anualmente entre los 18° y 32°C aproximadamente. En marzo se aproxima a los 15°C a una profundidad de 20m, el resto del año se mantiene entre los 20° y 28°C en su estrato profundo (Espinosa-Villegas, 1999).

Sobre el margen occidental, en las localidades conocidas como Santispac y El Coyote se ubican manantiales hidrotermales con temperaturas que oscilan

de 38° a 51°C. En el estero de Santispac, la temperatura varía entre 32.8° y 30.5°C (máxima y mínima diurnas respectivamente) (Espinosa-Villegas, 1999).

Respecto a la salinidad, ésta presenta variaciones mínimas alrededor del valor de 35‰ (Espinosa-Villegas, 1999).

Bahía de los Ángeles se encuentra localizada en la costa oeste del Golfo de California (Fig.1). Esta bahía es una de las más profundas del Golfo de California, tiene una profundidad máxima promedio de 40m (Canino-Herrera *et al.*, 1990).

La salinidad superficial dentro de la bahía es similar a la reportada para el Golfo norte, con valores de 35.25 y 35.55‰ para abril y octubre respectivamente (Canino-Herrera *et al.*, 1990).

El valor mínimo promedio de temperatura superficial es de 15°C, mientras que los valores máximos reportados oscilan entre los 28.5 y 29.8°C (Canino-Herrera *et al.*, 1990).

Bahía de los Ángeles se encuentra dentro de una zona afectada fuertemente por las mareas, por lo que posee características distintas a otras bahías y lagunas costeras de la costa este de Baja de California (Canino-Herrera *et al.*, 1990).



Figura 1. Áreas de colecta de muestras de sedimento.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

COLECTA Y PRE- TRATAMIENTO DE MUESTRAS

Se realizó un muestreo a lo largo del Golfo de California en el mes de Abril del 2008. Se obtuvieron muestras de los sitios de Bahía Concepción (Playa El Coyote, El Requesón, Santispac, Playa Armenta y Bahía Concepción), Loreto y Bahía de Los Ángeles. Para el desarrollo experimental de este trabajo se utilizarán las muestras de sedimento de las zonas de Bahía Concepción y Bahía de los Ángeles, B.C.

El sedimento se colectó de forma manual por buceo libre en las playas de El Requesón, El Coyote, Playa Armenta y Santispac, en el área de Bahía Concepción.

Las muestras de sedimento en Bahía de los Ángeles se colectaron por medio de una draga diseñada en el Instituto Oceanográfico de Scripps (UCSD) a bordo de una embarcación de pesca comercial. En cada estación de muestreo se tomaron hasta 5 muestras, en función del tipo de sedimento.

Todas las muestras de sedimento se colocaron en cajas Petri estériles, y se secaron al medio ambiente. Al estar completamente secas se almacenaron para su posterior tratamiento en el laboratorio.

En el laboratorio el sedimento se maceró en morteros estériles hasta deshacer las partículas de sedimento de mayor tamaño. Posteriormente al pre-tratamiento de las muestras se procedió al sembrado de éstas en los distintos medios de cultivo.

CULTIVO Y AISLAMIENTO DE ACTINOBACTERIAS

Para el cultivo de las actinobacterias presentes en las muestras de sedimento previamente tratadas, se utilizaron 6 medios de cultivo propuestos por Gontang *et al.* (2007), con la siguiente formulación para un litro de agua de mar:

1. M1: 18g de agar.
2. M2: 0.5g de manitol, 0.1g de peptona y 18g de agar.
3. M3: 1g de almidón, 0.2g de peptona, 0.4g de extracto de levadura y 18g de agar.

4. M4: 2.25g de manitol, 1g de peptona y 18g de agar.
5. M6: 2.25g de manitol, 0.2g de casa-aminoácidos y 18g de agar.
6. M8: 0.6g de triptona. 1g de casitona, 0.8g de glucosa y 18g de agar.

A cada medio se le adicionó ciclohexamida como antifungal y un antibiótico, rifampicina o gentamicina, ambos a una concentración de 5µg/ml.

Las muestras de sedimento fueron inoculadas en los diferentes medios de cultivo, con la técnica de estampado. Esta técnica consiste en tomar una submuestra de sedimento con una esponja estéril, la cual se estampa de manera circular en el medio de cultivo, creando un efecto de dilución (Prieto-Davó, 2002).

Una vez inoculadas las muestras, se dejaron incubar a 28°C por un periodo de 3-4 semanas aproximadamente, hasta observar la formación de colonias de actinobacterias.

Una vez que fue posible diferenciar las colonias, se procedió al aislamiento y purificación de cada una de éstas. Con un asa metálica se raspó la parte superior de cada colonia, para poder coleccionar sus esporas, y posteriormente con la técnica de estriado se inoculó en un nuevo medio de cultivo. Este procedimiento se realizó tantas veces fue necesario hasta lograr un cultivo puro de cada colonia identificada. El medio utilizado para aislar y purificar las cepas fue el medio A1, cuya formulación por litro de agua de mar incluye 10g de almidón, 4g de levadura, 2g de peptona y 18g de agar.

- PRUEBA DE REQUERIMIENTO DE AGUA DE MAR

Después del aislamiento y purificación, las cepas de actinobacterias se cultivaron en medio sólido A1 en agua destilada y desionizada (H₂O_{dd}). Para probar si los iones disueltos en el agua de mar son cruciales para su crecimiento, éstas se dejaron incubar por 4 semanas. Posteriormente al periodo de incubación se observó y registró su crecimiento bajo estas condiciones de cultivo.

CRIOPRESERVADO DE CEPAS

De cada cultivo puro de actinobacterias se tomó con un asa metálica estéril una porción de la colonia más aislada del estriado, ésta se transfirió a 10mL de medio de cultivo líquido A1. Después de un periodo de incubación de 7 días en un agitador giratorio, con una pipeta automática se tomaron 700µL de células y se pasaron a un tubo eppendorf estéril de 1.5mL, posteriormente se le adicionaron 300µL de glicerol previamente esterilizado. Este procedimiento se realizó hasta agotar las células del cultivo u obtener un mínimo de 5 tubos eppendorf.

Los tubos eppendorf con las células, se colocaron en el congelador a -70°C en el laboratorio de ecología molecular "Jorge de la Rosa Vélez" de la Facultad de Ciencias Marinas.

EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS

A partir del volumen del criopreservado se inició un cultivo de 10mL de cada cepa en medio líquido A1. Después de un periodo de incubación de 7 días, el cultivo fue escalado a 100mL. Para escalar los cultivos se vertieron los 10mL de cultivo inicial en 90mL de medio líquido A1 nuevo. Se dejaron incubar por 7 días en un agitador giratorio a aproximadamente 2100 rpm a una temperatura de 28°C. El periodo de incubación pudo variar entre cultivos, de acuerdo a su velocidad de crecimiento. En todos los casos el proceso de extracción se llevó a cabo hasta observar una alta densidad celular en el cultivo.

La extracción de compuestos de cada cultivo se llevó a cabo con el siguiente procedimiento. Se filtró el cultivo a través de un filtro comercial para separar la masa celular del medio líquido. La masa celular (M.C) se dejó en extracción con Metanol 100% (MeOH) durante 24h en agitación constante. Al medio líquido se le añadió 100mL de Acetato de etilo 100%, y se extrajo exhaustivamente en un embudo de separación para la obtención de dos fases, polar y no polar.

La fase no polar (Fase de Acetato de etilo) se rotaevaporó directamente hasta sequedad, posteriormente se obtuvo el peso correspondiente a la cantidad de compuestos extraídos para esta fase.

A la fase polar se le agregó 2g de amberlita XAD7HP, con la que se dejó en agitación constante por 24h para llevar a cabo la retención de los compuestos. Posteriormente al periodo de retención, se filtró por gravedad con un filtro comercial, para separarla de la fase líquida. La amberlita se dejó en

extracción con 100mL de MeOH 100% en agitación constante por 3h. Después de la extracción se rotaevaporó hasta sequedad para obtener el peso de los compuestos extraídos en esta fase.

Este procedimiento se realizó para cada cultivo de las diferentes cepas de actinobacterias seleccionadas.

PRUEBAS DE BIOACTIVIDAD

ACTIVIDAD CITOTÓXICA

Se tomó un 1mg de cada extracto y se redisolvió en 100 μ L de un solvente determinado de acuerdo al ensayo, para obtener una concentración final de 10mg/mL. Con una alícuota de cada muestra a esta concentración se realizaron los bioensayos de citotoxicidad contra las líneas celulares de cáncer de mama (MCF7), cérvico (HeLa) y pulmón (H460).

Las pruebas de citotoxicidad contra las líneas celulares de cáncer de mama (MCF7) y cáncer cérvico (HeLa), se realizaron en el Departamento de Biotecnología del Centro de Investigación y Educación Superior de Ensenada (CICESE), de acuerdo con el siguiente protocolo.

Se realizó un bioensayo preliminar para descartar los extractos crudos que no presentaran actividad. Se utilizó una placa de 96 pozos, a cada pozo se le añadió 100 μ L de suspensión celular, con una densidad celular de aproximadamente 5×10^3 células y se dejaron incubar 24 horas a 37° C y CO₂ al 5%. Posteriormente a cada pozo se agregaron 20 μ L de extracto a una

concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$ disuelto en H_2O dd, este ensayo se realizó por triplicado. Como control positivo se utilizó sulfóxido de dimetilo (DMSO) a una concentración final de 10%, como control negativo H_2O dd y medio de cultivo RMPI como blanco. Las placas se dejaron incubar 24 h a 37° C y 5% de CO_2 , posterior al periodo de incubación se evaluó el porcentaje de células viables por medio del método colorimétrico de proliferación celular *Cell Titer- Promega*.

Se agregaron 20 μL del reactivo revelador *Cell Titer* (solución de tetrazolio) y se dejó reaccionar por 3h. Las lecturas de absorbancia se realizaron cada hora en un lector de ELISA a 495nm. Se obtuvo el promedio aritmético de las absorbancias de los triplicados de las muestras, controles y blancos. La absorbancia promedio de los blancos se consideró el 100% de sobrevivencia celular y con base en este valor se calcularon los porcentajes de sobrevivencia para cada extracto. Se consideraron activos aquellos que presentaran un porcentaje de sobrevivencia menor al 50%.

Los bioensayos contra la línea celular H460 de cáncer de pulmón y actividad en canales de sodio (activador (ACS) y bloqueador de canales de sodio (BCS) se llevarón a cabo por el Laboratorio del Dr. William Gerwick del Centro de Biotecnología Marina y Biomedicina en el Instituto de Oceanografía de Scripps (UCSD). De estos ensayos se obtuvo la actividad citotóxica, en función al porcentaje de sobrevivencia celular observado, y como ACS o BCS de los canales de sodio, para los diferentes extractos de actinobacterias analizados.

ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA

Las pruebas de actividad antibiótica se llevaron a cabo en el Departamento de Química de la Universidad de Hawaii en Manoa por la M.C Natalie Millán Aguiñaga.

Se evaluó la actividad antibiótica de los extractos crudos polares obtenidos contra las cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* resistente a la metacilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* (SA), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Acinetobacter baumannii* (AB), *Escherichia coli* (EC) y el hongo *Candida albicans* (CA).

Los extractos se probaron a una concentración de 100mg/mL en DMSO y se obtuvo la concentración media inhibitoria (IC₅₀) en µg/mL. Para llevar a cabo el ensayo se utilizó el método de dilución en placas de 96 pozos, después de un periodo de incubación para cada patógeno se leyó su absorbancia a 420 y 620nm para conocer la actividad de cada extracto en función a el porcentaje de sobrevivencia celular observado (Millán-Aguiñaga, 2009).

EVALUACIÓN DE CRECIMIENTO DE CEPAS BIOACTIVAS

ENSAYO DE INCORPORACIÓN DE ^3H -LEUCINA

El ensayo de incorporación de ^3H -Leucina se realizó en las instalaciones de la División de Biología Marina del Instituto de Oceanografía de Scripps (UCSD) en el laboratorio del Dr. Farooq Azam. Se realizó un experimento de piloto con la cepa de actinobacteria S-178 del laboratorio de Química Marina de la Facultad de Ciencias Marinas (UABC), de acuerdo con el método de microcentrífuga descrito por Smith y Azam (1992) para la medición de la incorporación de ^3H -Leucina.

Se llevaron a cabo dos tratamientos con diferente tiempo de incubación (1h y 24h), para ambos casos el ensayo se realizó por triplicado y con un control por muestra. Se adicionaron $3\mu\text{L}$ de ^3H -Leucina (155Ci mmol^{-1}) a una concentración final de 20 nM a cada un tubo Fisher para microcentrífuga (con tapa de rosca y sello de silicón) utilizado, a partir de este momento los tubos se colocaron en hielo hasta terminar el procedimiento.

A cada tubo se le agregó 1mL de medio de cultivo bacteriano, se cerró y se invirtió para mezclar la muestra. A los tubos control se les agregó $89\mu\text{L}$ de TCA 100%. Las muestras se dejaron incubar a temperatura ambiente por el periodo correspondiente según su tratamiento.

Las siguientes adiciones se realizaron sobre hielo. Posterior el periodo de incubación las reacciones de las muestras, excepto los controles, se detuvieron con la adición de $89\mu\text{L}$ de TCA 100% y se mezclaron. Se marcó un extremo de la tapa de cada tubo y se colocaron en una microcentrífuga Eppendorf con el

lado marcado hacia fuera. Se centrifugaron por 10 minutos a 16,000 xg para la formación de los pellets celulares.

Se aspiró el sobrenadante (del lado opuesto a la marca) y se adicionaron 1.5mL de TCA 5%, se invirtieron y se centrifugaron como se mencionó anteriormente. Después de centrifugar, se aspiró el sobrenadante y se agregaron 1.5mL de Etanol 80%, se invirtieron y centrifugaron bajo las mismas condiciones.

Se aspiró el sobrenadante y se adicionaron 0.5ml del cocktail de centelleo Ultima Gold BD y se mezclaron con un vórtex. Después de la adición del cocktail los tubos se dejaron a temperatura ambiente. Posteriormente los tubos se mezclaron nuevamente con un vórtex y se colocaron dentro de un vial de centelleo de 7mL para llevar a cabo el radioensayo.

El radioensayo se realizó en un contador de centelleo Beckman LS 6000TA con el programa de incorporación del radio isótopo utilizado, para obtener las desintegraciones por minuto (DPM) de cada muestra.

Para llevar a cabo los cálculos necesarios para obtener los valores de incorporación de ^3H -Leucina, producción bacteriana (BP), tasa específica de crecimiento (μ) y tiempo de generación (g) con base en el valor de DPM, se consideró lo siguiente:

El número de DPM se convirtió a nmol de Leucina para lo que consideró un factor de conversión de 2.22×10^{12} DPM por Ci. Con base en la actividad específica de la Leucina utilizada se calculó la cantidad de nanomoles de Leucina incorporados por unidad de volumen y tiempo ($\text{nmol Leu L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Para calcular la producción bacteriana en términos de $\text{kg C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (BP) se utilizó la fórmula matemática $\text{BP} = \text{Leucina incorporada (mol Leu L}^{-1} \text{ h}^{-1}) \times 1.5 \text{ kg C mol Leu}^{-1}$ (considerando un factor de dilución igual a 1). La biomasa bacteriana (B) se estimó a partir de la abundancia celular calculada con base en la cuantificación de proteínas realizada y con un factor de conversión proteína-carbono de 10 fg C, para ser expresada en unidades de kg C L^{-1} . Con los dos parámetros antes mencionados se calculó la tasa de crecimiento específica (μ) con base en la fórmula $\mu = \text{BP}/\text{B}$. El tiempo de generación (g) se calculó como $g = \ln(2)/\mu = 0.693/\mu$ (Kirchman, 2001).

CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS BACTERIANAS

El ensayo de prueba de cuantificación de proteínas se llevó a cabo con la cepa S-178 mencionada anteriormente. Para la detección y cuantificación de proteínas totales se utilizó el método colorimétrico del kit Micro BCA Protein Assay-Thermo Fisher Scientific.

Previo a la cuantificación de las muestras se prepararon la solución de trabajo y una curva de calibración. Para la preparación de la solución de trabajo se calculó el volumen total a utilizar en cada ensayo y se mezclaron los siguientes componentes del kit: 50 partes de la solución A, 48 partes de la solución B y 2 partes de la solución C. A partir del estándar de Albumina (2mg/ml) se hizo una curva de calibración con una concentración de proteínas mínima de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ y máxima de 100 $\mu\text{g/ml}$. En total se prepararon 8 soluciones estándar.

Se realizó un tratamiento a las células bacterianas antes de realizar el ensayo de cuantificación de proteínas. Se tomaron 3 alícuotas de 1mL del medio de cultivo bacteriano y se vertieron en tubos eppendorf. Cada muestra de cultivo se homogenizó con un pistilo de polipropileno y posteriormente se centrifugó a 11000 RPM por 10min.

Una vez obtenido el pellet celular se aspiró el medio de cultivo sobrenadante y se agregó 1mL de agua MilliQ. El pellet celular fue resuspendido con un vórtex para enjuagar las células. Después del enjuague se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones. Se llevaron a cabo 3 series de enjuagues y finalmente el pellet se dejó en agua MilliQ.

Para extraer las proteínas celulares, el pellet previamente obtenido se lavó con un buffer de lisis (1M Tris-HCl, 0.5M EDTA, Triton X-100 y PBS 10X). Para el ensayo de cuantificación de proteínas se utilizó la solución obtenida de este lavado celular.

En una placa de 96 pozos se colocaron 100µL de cada solución estándar y de cada alícuota de medio de cultivo bacteriano, a cada pozo con muestra se le agregaron 100µL de la solución de trabajo. La placa se dejó incubar a 60° C por 1h, posterior al periodo de incubación se leyó su absorbancia a 562nm en un lector de placas Spectramax M2 para después obtener la concentración total de proteínas en la alícuota bacteriana.

Las lecturas de las soluciones estándar se realizaron por duplicado y para las muestras por triplicado. La cuantificación de proteínas se realizó diariamente durante el periodo de cultivo de la cepa de actinobacteria (7-10 días) con el

propósito de obtener una curva de crecimiento en función a la variación promedio de la concentración de proteínas bacterianas con respecto al tiempo.

Con el valor de la concentración de proteínas se hizo una estimación de la concentración celular (células mL⁻¹) en el cultivo bacteriano a lo largo del periodo de incubación, se consideró que la concentración de proteínas por célula en general equivale a un 50% del peso seco total o tiene un peso aproximado de 1-3pg por célula. De esta forma de acuerdo a la variación en la concentración de proteínas en el tiempo se obtuvo indirectamente una curva de la variación en el número de células con respecto al tiempo.

CUANTIFICACIÓN DE DNA BACTERIANO

Se realizó un ensayo de prueba de la cuantificación de DNA bacteriano con la cepa de actinobacteria S-178. Para este ensayo se utilizó un método de tinción con fluorescencia para ácidos nucleicos ultrasensible para la doble hélice de DNA con el kit Quant-iT PicoGreen dsDNA Reagent –Invitrogen (Invitrogen, 2008). Esta técnica permite cuantificar fluorométricamente, a una longitud de onda de excitación de 480nm y de emisión de 520nm, la concentración de DNA con un límite mínimo de 25 pg mL⁻¹. El brillo característico del agente PicoGreen se debe a su alta producción de quantum y su alto coeficiente de extinción. Su fluorescencia se incrementa al unirse a la hebra de DNA bajo la excitación a una cierta longitud de onda (Singer *et al.*, 1997).

De acuerdo a las especificaciones del proveedor, se prepararon las siguientes soluciones: el Buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5), el cual se utilizó para diluir la solución de PicoGreen y en el ensayo en general, y la solución de trabajo PicoGreen. El Buffer TE 20X incluido en el kit se diluyó 20 veces con agua MiliQ filtrada a 0.2µm y estéril, para obtener una solución Buffer TE con una concentración final de 1X. Se diluyó la solución estándar PicoGreen 200 veces en Buffer TE 1X. Para preparar la solución de trabajo PicoGreen, se preparó tanta solución de trabajo como era necesaria para el día de trabajo en función al número de muestras a probar.

A partir de la solución estándar de DNA incluída en el kit, se preparó una solución de trabajo a una concentración de 2µg/ml con la cual se realizó una curva de calibración con una concentración de DNA mínima de 1ng/ml y máxima de 1µg/ml y un blanco, en total se prepararon 5 soluciones estándar.

Al igual que con el procedimiento para la cuantificación de proteínas, se tomaron 3 alícuotas del cultivo bacteriano y previo al ensayo se trataron como se describió anteriormente.

En una placa negra de 96 pozos se colocaron 50µL de cada solución estándar y de cada alícuota de cultivo bacteriano, a cada pozo con muestra se le agregaron 50µL de la solución de trabajo PicoGreen. La placa se dejó incubar a temperatura ambiente protegida de la luz por 5 minutos, posterior al periodo de incubación se leyó su fluorescencia longitudes de onda de 480nm (excitación) y 520nm (emisión) en un lector de placas Spectramax M2 para después obtener la concentración total de DNA de la alícuota bacteriana.

Las lecturas de las soluciones estándar se realizaron por duplicado y para las muestras por triplicado. La cuantificación de DNA se realizó diariamente durante el periodo de cultivo de la cepa de actinobacteria (7-10 días) con el propósito de obtener una curva de crecimiento en función a la variación promedio de la concentración de DNA bacteriano con respecto al tiempo.

VOLUMEN CELULAR EMPACADO (PCV)

El volumen celular empacado es una técnica rápida y económica de cuantificación celular, que permite hacer estimaciones de la variación en la concentración celular en función a los cambios en el volumen acumulado de éstas por centrifugación. Sin embargo, esta técnica tiene un bajo nivel de precisión que puede ser influenciado por la morfología de las células, como ocurre con microorganismos filamentosos (Rhodes y Stanbury, 2001).

Con base en lo antes mencionado, la estandarización de la técnica fue imprescindible para asegurar datos de volumen celular correctos. Se realizaron diferentes ajustes a la técnica original como el aumento en el volumen de muestra y se incrementó la velocidad y tiempo de centrifugación principalmente. Lo anterior con la finalidad de obtener un cúmulo de células (pellet) lo suficientemente bien concentrado o empacado en la columna de los tubos graduados utilizados. La descripción de la técnica utilizada y sus especificaciones se describen a continuación.

Se tomaron tres alícuotas de 1ml del cultivo bacteriano y se colocaron en diferentes tubos eppendorf. Cada muestra de cultivo se homogenizó con un pistilo de polipropileno hasta desintegrar los cúmulos celulares. De cada muestra se tomaron 100 μ L y se colocaron en tubos graduados para volumen celular empacado (Tubos PCV) con capacidad de 5 μ L en la columna de empacado, se realizaron triplicados para cada muestra. Los tubos PCV se cerraron con parafilm y se centrifugaron por dos ciclos de 25min a 23000 RPM.

Después de los ciclos de centrifugado, se tomaron las lecturas del volumen total del pellet bacteriano que se formaba en la columna del tubo PCV. Este procedimiento se realizó diariamente a lo largo del periodo de cultivo de la cepa S-178, con base en el volumen empacado promedio se obtuvo una curva de crecimiento en función al incremento de volumen celular empacado con respecto al tiempo. Con base en el PCV se hizo una estimación del número de células por mililitro, para la conversión entre las unidades de volumen y peso se consideró un peso de 1pg por célula bacteriana.

DETERMINACIÓN DE PESO SECO

Se utilizaron filtros Whatman GF/F de microfibra de vidrio de tamaño de poro de 0. μm de peso conocido.

Se tomaron tres alícuotas de 1mL del medio de cultivo bacteriano de la cepa S-178. Cada mililitro se filtró al vacío (5mm Hg) a través de un filtro Whatman por medio de una columna de vidrio de 10ml de capacidad y 7cm de diámetro y una bomba de vacío manual.

Antes de remover los filtros de la columna, éstos se enjuagaron con 2mL de agua Milli Q estéril para remover sales. Los filtros con masa celular se colocaron en cajas petri y se dejaron secar en una estufa a 60° C durante la noche. Posteriormente se pesaron en la microbalanza antes utilizada y se obtuvo la diferencia de peso entre el valor inicial y final. El valor resultante se consideró como el peso seco bacteriano, del cual se obtuvo un valor promedio para cada día de lectura. Este procedimiento no se realizó diariamente a lo largo del periodo de cultivo de la cepa bacteriana utilizada.

Los valores de peso seco se utilizaron para la estandarización de la cuantificación de proteínas con el método colorimétrico MicroBCA. Se consideró que el 50% de peso seco (Simon y Azam, 1989) correspondía al valor de la concentración de proteínas en $\mu\text{g mL}^{-1}$.

RESULTADOS

ABUNDANCIA DE ACTINOBACTERIAS

Se obtuvieron un total de 235 cepas de actinobacterias a partir de las 43 muestras de sedimento de los 13 sitios de muestreo, distribuidas en los 12 diferentes medios de cultivo utilizados. En general el mayor número de cepas se aislaron de las muestras de Bahía Concepción (174 cepas), principalmente de Santispac (114 cepas) con un 48% de recuperación del total de cepas encontradas. De las muestras de Bahía de Los Ángeles se aislaron el 25% (61 cepas) del total de las actinobacterias recuperadas. Las cepas se dividieron en dos grupos principalmente (fig. 2 y 3).

Las cepas del primer grupo (G1) se caracterizaron por formar colonias color blanco o anaranjadas con textura aterciopelada, y con un micelio radial fragmentado en cadenas de esporas. Por sus características morfológicas, este grupo se denominó "actinobacterias tipo *Streptomyces*" (Bredholt *et al.*, 2008).

De este grupo se obtuvieron 166 cepas morfológicamente distintas, que corresponden a un 71% del total de actinobacterias cultivadas, las cuales se recuperaron a partir de las distintas muestras de sedimento (fig.2). Aproximadamente el 67% (111 cepas) de este grupo se obtuvieron de las muestras de Santispac, siendo este el sitio con el porcentaje de recuperación más alto, mientras que las muestras de "Playa Armenta" tuvieron el porcentaje de recuperación más bajo de 0.6% (1 cepa). La distribución del total de cepas obtenidas por sitio de muestreo se muestra en la figura 2.

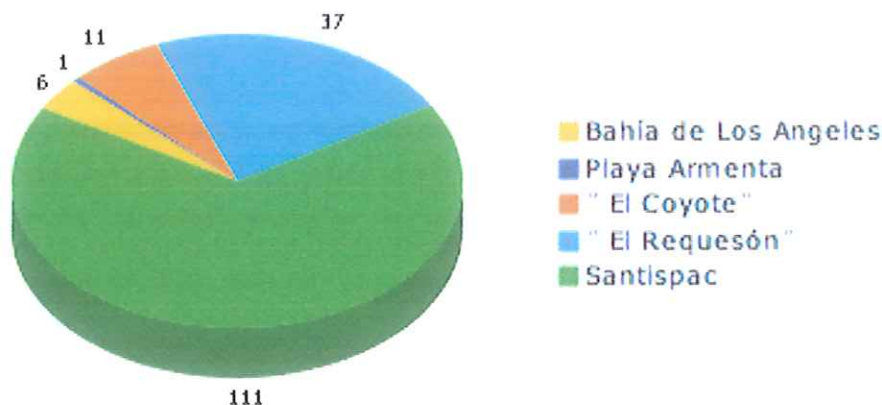


Figura 2. Abundancia de las cepas de actinobacterias tipo *Streptomyces*. Se muestra el número total de actinobacterias tipo *Streptomyces* aisladas por estación de muestreo: Bahía de los Ángeles (amarillo) 6 bacterias, Playa Armenta (azul) 1 bacteria, Playa "El Coyote" (anaranjado) 11 bacterias, Playa "El Requesón" (cian) 37 bacterias y Santispac (verde) 111 bacterias.

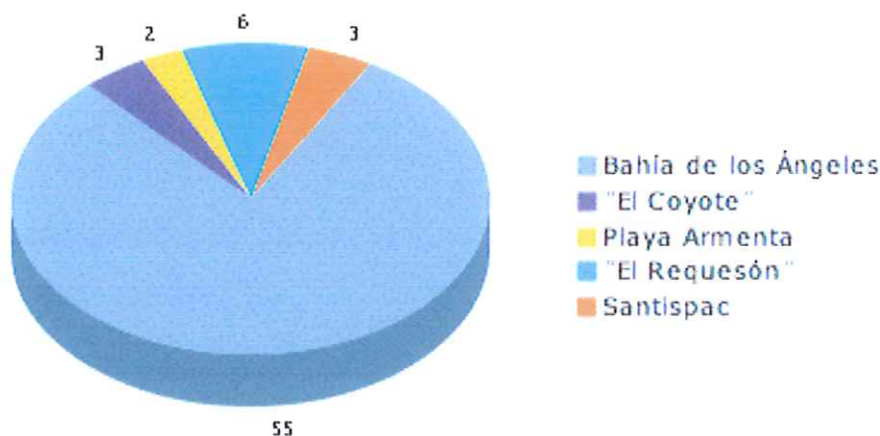


Figura 3. Abundancia de las cepas de actinobacterias tipo *Micromonospora*. Se representa en una gráfica de pie el número total de actinobacterias tipo *Micromonospora* aisladas por estación de muestreo: Bahía de los Ángeles (azul) 55 bacterias, Playa "El Coyote" (morado) 3 bacterias, Playa Armenta (amarillo) 2 bacterias, Playa "El Requesón" (cian) 6 bacterias y Santispac (anaranjado) 3 bacterias.

El segundo grupo de actinobacterias se caracterizó por formar colonias de color anaranjado, con textura sólida y sin hifas, que generalmente producían esporas negras o del color de la colonia. A este grupo se le denominó "actinobacterias tipo *Micromonospora*" (Bredholt *et al.*, 2008).

Del segundo grupo (G2) de actinobacterias se obtuvieron 69 cepas distintas, correspondientes a un 29% del total recuperado y distribuidas en los diferentes sitios de muestreo (fig.3). Las muestras de Bahía de los Ángeles presentaron el mayor porcentaje de recuperación con un 80% (55 cepas) aproximadamente, por el contrario las muestras de "Playa Armenta" tuvieron sólo un 3% (2 cepas), siendo este el sitio de muestreo con el porcentaje de recuperación más bajo. La abundancia de cepas obtenidas por estación de muestreo se presenta en la figura 3.

Del total de 235 actinobacterias aisladas, sólo el 42 (18%) crecieron únicamente en agua de mar y pertenecen al grupo de actinobacterias tipo *Micromonospora* (G2). El 82% (193 cepas) restante mostró crecimiento tanto en el medio con agua de mar como en agua destilada y desionizada (H₂O_{dd}).

Dentro del porcentaje de actinobacterias que mostró crecimiento en H₂O_{dd}, el 70% (166 cepas) corresponde al total de las actinobacterias tipo *Streptomyces* (G1) y el 12% (27 cepas) a actinobacterias del tipo *Micromonospora*.

Con base en su crecimiento bajo estas condiciones, las actinobacterias del tipo *Micromonospora* se pueden clasificar tentativamente como pertenecientes a los géneros *Micromonospora* y *Salinispora*. Las cepas que

mostraron una clara dependencia del agua de mar para su crecimiento, se consideran dentro del género *Salinispora*, mientras que aquellas cuyo crecimiento es independiente del agua de mar se consideran pertenecientes al género *Micromonospora*.

De acuerdo con lo anterior, el 18% (42 cepas) del total de actinobacterias aisladas, se sugiere pertenecen al género *Salinispora*, y éstas corresponden al 61% de las cepas del grupo tipo *Micromonospora*.

Respecto a la recuperación de cepas en función al medio de cultivo empleado para aislarlas, el medio M3G presentó mayor número de cepas recuperadas (53 cepas) que corresponden al 22% del total de actinobacterias. Del grupo tipo *Streptomyces* (G1) se obtuvieron 33 cepas y del grupo tipo *Micromonospora* (G2) 20 cepas, que corresponden al 20% y 29% del total de cada grupo, respectivamente (fig.4).

Para G1 los medios M2G, M3R y M8G mostraron un porcentaje de recuperación similar entre sí y menor al máximo del grupo, aproximadamente del 13%. El resto de los medios de cultivo presentaron un porcentaje de recuperación por debajo del 10% del total de actinobacterias de este grupo.

En el caso de G2 los medios M1G y M2G mostraron un porcentaje de recuperación menor al máximo observado e igual a 20%. Los demás medios de cultivo presentaron un porcentaje de recuperación menor e igual a 10%.

El número de cepas de actinobacterias obtenidas de cada medio de cultivo empleado se muestra en el histograma de la figura 4.

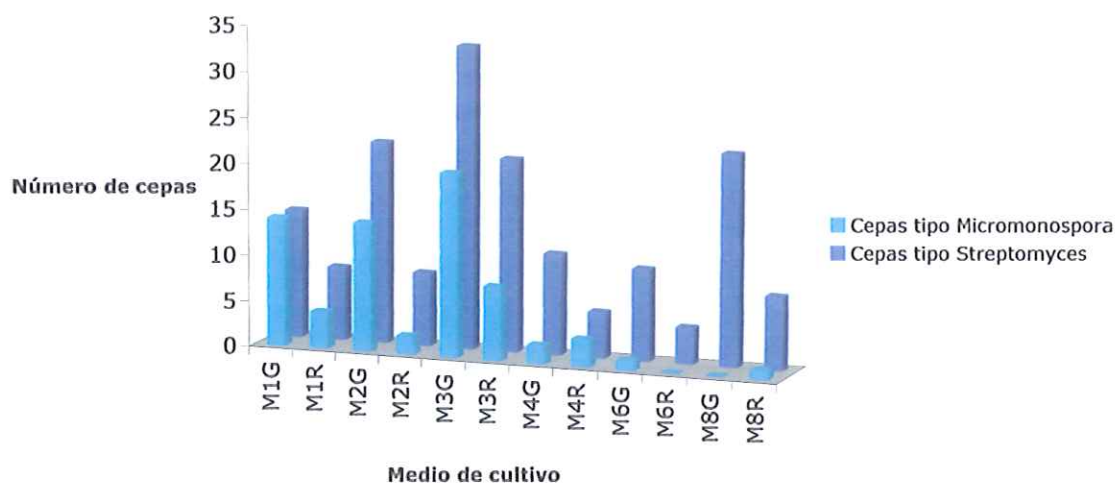


Figura 4. Histograma del número total de cepas obtenidas de los diferentes medios de cultivo. Las abreviaturas de los medios de cultivo utilizados (eje de las abscisas) se encuentran descritas anteriormente en la metodología de cultivo y aislamiento del presente trabajo. Las barras color azul marino representan el total de actinobacterias tipo *Streptomyces* aisladas a partir de cada medio de cultivo utilizado. El total de actinobacterias tipo *Micromonospora* aisladas de los diferentes medios de cultivo utilizados se encuentra representado por las barras color cian.

PRUEBAS DE BIOACTIVIDAD

Se obtuvieron los extractos crudos de 48 cepas de actinobacterias, elegidas al azar dentro del grupo de tipo *Micromonospora*. Se realizaron los bioensayos de actividad citotóxica con 40 de éstos y para los ensayos de actividad antibiótica se probaron 25 extractos.

ACTIVIDAD CITOTÓXICA

Para la línea celular MCF7 de cáncer de mama, 15 extractos crudos en su fracción no polar (acetato de etilo) presentaron actividad citotóxica, con un porcentaje de sobrevivencia celular menor al 50% a una concentración de 20 µg/mL (tabla I). La fracción polar de éstos (metanol) no mostró tener actividad contra esta línea celular.

El total de extractos activos para la línea celular MCF7, corresponden al 37.5% del total probado. Catorce de éstos (93%) se obtuvieron a partir de actinobacterias aisladas de los sedimentos de Bahía de los Ángeles. El 57% de estas cepas tuvo un crecimiento dependiente de agua de mar y por lo tanto pueden pertenecer al género *Salinispora*. El 43% restante no presentó un crecimiento dependiente del agua de mar, por lo que sólo se puede decir que probablemente pertenezcan al género *Micromonospora* (tabla I).

Sólo un extracto de una cepa aislada de los sedimentos de Bahía Concepción (de la playa "El Requesón") presentó actividad contra la línea celular de cáncer de mama MCF7, y por sus características puede pertenecer al género *Micromonospora* (tabla I).

Para esta línea celular el extracto no polar de la cepa S-355, aislada de los sedimentos de Bahía de los Ángeles, presentó la mayor actividad citotóxica con un porcentaje de sobrevivencia celular del 20%. El extracto no polar de la cepa S-51, aislada del mismo sitio de muestreo, presentó la menor actividad citotóxica para esta línea celular con un porcentaje de sobrevivencia celular de 46.5%. Ambas cepas no mostraron un crecimiento dependiente de agua de mar,

por lo que sólo se puede considerar que pertenecen al género *Micromonospora* (tabla I).

Para la línea celular de cáncer cérvico HeLa, nueve extractos (22.5% del total de extractos probados) en su fracción no polar tuvieron actividad citotóxica, con un porcentaje de sobrevivencia celular menor al 50% a una concentración de 20 µg/mL (tabla I). La fracción polar de éstos no mostró tener actividad citotóxica contra esta línea celular.

El 77% de los extractos activos contra las células HeLa, se obtuvieron a partir de 7 cepas de actinobacterias aisladas de los sedimentos de Bahía de los Ángeles, de las cuales el 57% (4 cepas) tuvieron un crecimiento obligado en agua de mar, por lo que se sugiere que pertenecen al género *Salinispora*.

Sólo dos extractos (23% del total activo para células HeLa) obtenidos a partir de cepas aisladas de sedimentos de Bahía Concepción (playa Armenta y "El Requesón") mostraron actividad contra esta línea celular (tabla I). Las cepas de estos dos extractos, no mostraron un crecimiento dependiente de agua de mar y por sus características se considera que pueden pertenecer al género *Micromonospora*.

La mayor actividad citotóxica para esta línea celular la presentaron las cepas S-361 y S-165 con un porcentaje de sobrevivencia celular de 24.7%. Ambas cepas fueron aisladas de Bahía de los Ángeles y presentaron un crecimiento obligatorio en agua de mar, por lo que se considera que posiblemente pertenezcan al género *Salinispora*.

La cepa S-178 presentó la menor actividad citotóxica con un porcentaje de sobrevivencia celular de 49.3%. Ésta se aisló de sedimentos de Bahía de los Ángeles y no tuvo un crecimiento obligado en agua de mar, por sus características se considera que pertenece al género *Micromonospora*.

Para la línea celular H460 de cáncer de pulmón ninguno de los extractos probados en su fracción polar mostró actividad citotóxica. No se realizaron ensayos de actividad citotóxica con la fracción polar de éstos, por lo que su posible actividad aún no es conocida.

ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA

Se probaron 25 extractos crudos polares contra 6 diferentes cepas de patógenos de los cuales sólo 3 mostraron una potencial actividad antibiótica únicamente contra el patógeno MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a la metacilina) con un porcentaje de sobrevivencia celular menor al 40% (tabla II).

Las 3 cepas que mostraron actividad antibiótica contra la cepa MRSA fueron aisladas de los sedimentos de Bahía de los Ángeles. Dos de éstas mostraron un crecimiento dependiente del agua de mar (S-370 y 369) y por lo tanto del tipo *Salinispora*. La cepa S-355 no mostró un crecimiento dependiente del agua de mar por lo que se considera del tipo *Micromonospora*.

El extracto de la cepa S-370 mostró la mayor actividad con un porcentaje de sobrevivencia celular del 3%, mientras que el extracto de la cepa S-355 mostró la menor actividad contra este patógeno con un 32% de sobrevivencia celular (tabla II).

El resto de los extractos no mostraron tener una actividad antibiótica para alguno de los patógenos probados. En algunos casos se observan porcentajes de sobrevivencia celular mayores al 100% (tabla II), lo cual indica que no hubo inhibición alguna en el crecimiento de dicho patógeno.

Tabla I. Resultados de actividad citotóxica y para canales de sodio de los extractos crudos de las cepas tipo *Micromonospora*. En la columna SWG (Crecimiento en agua de mar) se muestra en color rojo (H₂O) aquellas que presentaron un crecimiento no dependiente de agua de mar. En color azul (SW) se presentan las cepas que mostraron un crecimiento dependiente de agua de mar. Se muestran los valores de actividad en porcentaje de sobrevivencia celular para las líneas celulares MCF7 (cáncer de mama) y HeLa (cáncer cérvico).

Cepa	Sitio de muestreo	SWG	MCF7	HeLa	Cepa	Sitio de Muestreo	SWG	MCF7	HeLa
S-375	Bahía de los Ángeles				S-378(R)	Bahía de los Angeles		32	
S-51	Bahía de los Ángeles		46.5		S-165	Bahía de los Angeles		38	24.7
S-10	Bahía de los Angeles		39		S-367	Coyote			
S-150	Bahía de los Angeles		32		S-367(Acetona)	Coyote			
S-41	Bahía de los Angeles				S-367				
S-378	Bahía de los Angeles				(Acetona:MeOH)				
S-178	Bahía de los Angeles		30.5	49.3	S-351	Coyote			
S-113	Bahía de los Angeles				S-133	Playa Armenta			45.6
S-355	Bahía de los Angeles		20		S-132	Requesón			
S-365	Bahía de los Angeles		32		S-391	Requesón			
S-69	Bahía de los Angeles				S-925	Requesón			
S-361C	Bahía de los Angeles				S-889	Requesón			
S-369	Bahía de los Angeles	H ₂ O	35	28.4	S-366C	Requesón			
S-137	Bahía de los Angeles	SW	41.5	48	S-353	Requesón		27	25.6
S-361	Bahía de los Angeles		25.5	24.7	S-501	Requesón			
S-51R	Bahía de los Angeles				S-65	Bahía de los Angeles			
S-360	Bahía de los Angeles		38		S-32	Bahía de los Angeles			
S-360(DCM)	Bahía de los Angeles				S-84	Bahía de los Angeles			
S-72	Bahía de los Angeles				S-352	Bahía de los Angeles			
S-370	Bahía de los Angeles				S-85	Bahía de los Angeles			
S-359	Bahía de los Angeles				S-379	Bahía de los Angeles			
S-372	Bahía de los Angeles		29	25.8	S-373	Bahía de los Angeles			
S-217	Bahía de los Angeles				S-216	Bahía de los Angeles			
S-362	Bahía de los Angeles		40.6	36.2	S-198	Bahía de los Angeles			
					Santispac				
									Ensayos pendientes

Tabla II. Valores de actividad antibiótica de los extractos crudos en su fracción polar contra los diferentes patógenos probados. El valor de actividad está dado en porcentaje de sobrevivencia celular, por lo que aquellos con un valor menor al 40% (amarillo) se consideran activos contra los patógenos (CA: *Candida albicans*, EC: *Escherichia coli*, PA: *Pseudomonas aeruginosa*, MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a la metacilina, SA: *Staphylococcus aureus* y AB: *Acinetobacter baumannii*).

Cepa	Sitio de muestreo	Patógenos					
		CA	EC	PA	MRSA	SA	AB
S-375	Bahía de Los Ángeles	131	178	73	100	120	129
S-10	Bahía de Los Ángeles	82	121	80	90	140	112
S-361	Bahía de Los Ángeles	-	151	65	94	164	-
S-178	Bahía de Los Ángeles	54	193	71	96	131	120
S-369	Bahía de Los Ángeles	93	171	96	6	127	121
S-361c	Bahía de Los Ángeles	-	145	64	94	119	95
S-501	Bahía Concepción	-	182	94	99	117	90
S-889	Bahía Concepción	-	117	74	86	108	88
S-355	Bahía de Los Ángeles	96	123	59	32	93	94
S-137	Bahía de Los Ángeles	99	148	58	91	118	92
S-113	Bahía de Los Ángeles	102	172	88	98	120	-
S-353	Bahía Concepción	-	148	66	101	101	-
S-365	Bahía de Los Ángeles	-	151	91	102	149	-
S-370	Bahía de Los Ángeles	-	127	96	3	144	109
S-366c	Bahía Concepción	113	112	90	94	116	88
S-69	Bahía de Los Ángeles	103	90	89	91	131	83
S-391	Bahía Concepción	101	134	121	88	110	101
S-132	Bahía de Los Ángeles	106	124	72	92	118	94
S-150	Bahía de Los Ángeles	94	103	85	93	119	84
S-351	Bahía Concepción	92	111	92	92	95	94
S-367	Bahía Concepción	102	108	66	98	140	87
S-925	Bahía Concepción	103	169	61	94	102	89
S-360	Bahía de Los Ángeles	97	115	85	98	121	95
S-133	Bahía Concepción		124	93	68	94	-
S-51	Bahía de Los Ángeles		103	108	79	144	-

EVALUACIÓN DE CRECIMIENTO DE CEPAS BIOACTIVAS

ENSAYO DE INCORPORACIÓN DE ^3H -LEUCINA

Se tomó como referencia de la actividad bacteriana los valores de incorporación de ^3H -Leucina de una muestra de agua de mar tomada del muelle del Instituto de Oceanografía de Scripps. Ésta fue tratada previamente con el protocolo antes descrito con un tiempo de incubación de 1h. Se obtuvo un valor de incorporación de ^3H -Leucina promedio de 8.85×10^{-11} mol Leu $\text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$. Con base en la incorporación de ^3H -Leucina se calculó un valor de producción bacteriana de 1.33×10^{-10} kg C $\text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$ (fig.5), con lo que se estimó una tasa de crecimiento específica (μ) promedio de 0.45 d^{-1} y un tiempo de generación (g) promedio de 36h (1.5 días) (tabla III).

Los resultados del radioensayo del tratamiento de una hora de incubación para la cepa de actinobacteria S-178 no mostraron diferencia entre los valores de los blancos y las muestras, por lo tanto no fueron considerados (tabla III).

En el tratamiento de 24h de incubación se observó un número promedio de DMP mayor al del tratamiento de 1h de incubación. Se calculó un valor total promedio de incorporación de ^3H -Leucina de 1.49×10^{-11} mol Leu $\text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$, dos ordenes de magnitud mayor que el tratamiento de 1h y 7 veces menor en el mismo orden de magnitud que la muestra de agua de mar (tabla III).

Tabla III. Cálculos de incorporación de ^3H - Leucina, Producción Bacteriana (PB), Tasa específica de crecimiento (μ) y Tiempo de generación (g) para la cepa de actinobacteria S-178.

Categoría bacteriana	DPM Blanco	DPM Muestra corregido	Incorp. de Leucina ($\text{nmol Leu L}^{-1} \text{d}^{-1}$)	Incorp. de Leucina ($\text{nmol Leu L}^{-1} \text{h}^{-1}$)	Incorp. de Leucina ($\text{mol Leu L}^{-1} \text{h}^{-1}$)	Producción bacteriana (PB) ($\text{kg C L}^{-1} \text{h}^{-1}$) (FC= 1.5kg C mol Leu $^{-1}$)	Abundancia celular (células L^{-1})	Biomasa bacteriana (kg C) (FC= 10fg C)	Tasa específica de crecimiento (d^{-1})	Tiempo de generación (d^{-1})
Muestra de agua de mar (1h incubación)	225	51544	-	0.0881	8.81E-11	1.32E-10	7.00E+08	7.00E-09	4.53E-01	1.5
	187	53844	-	0.0920	9.20E-11	1.38E-10	7.00E+08	7.00E-09	4.73E-01	1.5
		49918	-	0.0853	8.53E-11	1.28E-10	7.00E+08	7.00E-09	4.39E-01	1.6
Promedio Actinobacteria (1h incubación)	206	51769	-	0.0885	8.85E-11	1.33E-10	7.00E+08	7.00E-09	4.55E-01	1.5
	381	405	-	1.18E-03	1.18E-12	1.77E-12	1.22E+10	1.22E-07	3.47E-04	8.3
	303	322	-	9.36E-04	9.36E-13	1.40E-12	1.22E+10	1.22E-07	2.76E-04	10.5
		263	-	7.64E-04	7.64E-13	1.15E-12	1.22E+10	1.22E-07	2.26E-04	12.8
Promedio Actinobacteria (24h incubación)	342	330	-	9.59E-04	9.59E-13	1.44E-12	1.22E+10	1.22E-07	2.83E-04	10.5
	381	5683	1.65E-11	6.88E-04	6.88E-13	1.03E-12	2.50E+10	2.50E-07	9.91E-05	29.1
	303	4435	1.29E-11	5.37E-04	5.37E-13	8.06E-13	2.50E+10	2.50E-07	7.73E-05	37.3
		5285	1.54E-11	6.40E-04	6.40E-13	9.60E-13	2.50E+10	2.50E-07	9.22E-05	31.3
Promedio	342	5.13E+03	1.49E-11	6.22E-04	6.22E-13	9.33E-13	2.50E+10	2.50E-07	8.95E-05	32.6

FC= Factor de conversión utilizado

Con respecto a la producción bacteriana se obtuvo un valor total de $1.89 \times 10^{-11} \text{ kgC L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (fig.5). Este valor es un orden de magnitud mayor al obtenido para el tratamiento de 1h, con una diferencia de $1.74 \times 10^{-11} \text{ kg C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, y un orden de magnitud menor con respecto al observado para el agua de mar con una diferencia de $1.14 \times 10^{-10} \text{ kgC L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Con base en el valor de producción bacteriana y la estimación del número de bacterias se calculó un valor promedio de μ igual a $7.54 \times 10^{-5} \text{ d}^{-1}$, y un valor promedio de g igual a 38 días (tabla III). Con respecto a la tasa de crecimiento específica (μ) hay una diferencia de un orden de magnitud con la calculada para el tratamiento de 1h y de cuatro ordenes de magnitud con respecto a la observada para el agua de mar. El valor del tiempo de generación calculado para este tratamiento resulta 4 veces mayor al observado para el tratamiento de 1h y 25 veces mayor con respecto al valor para agua de mar.

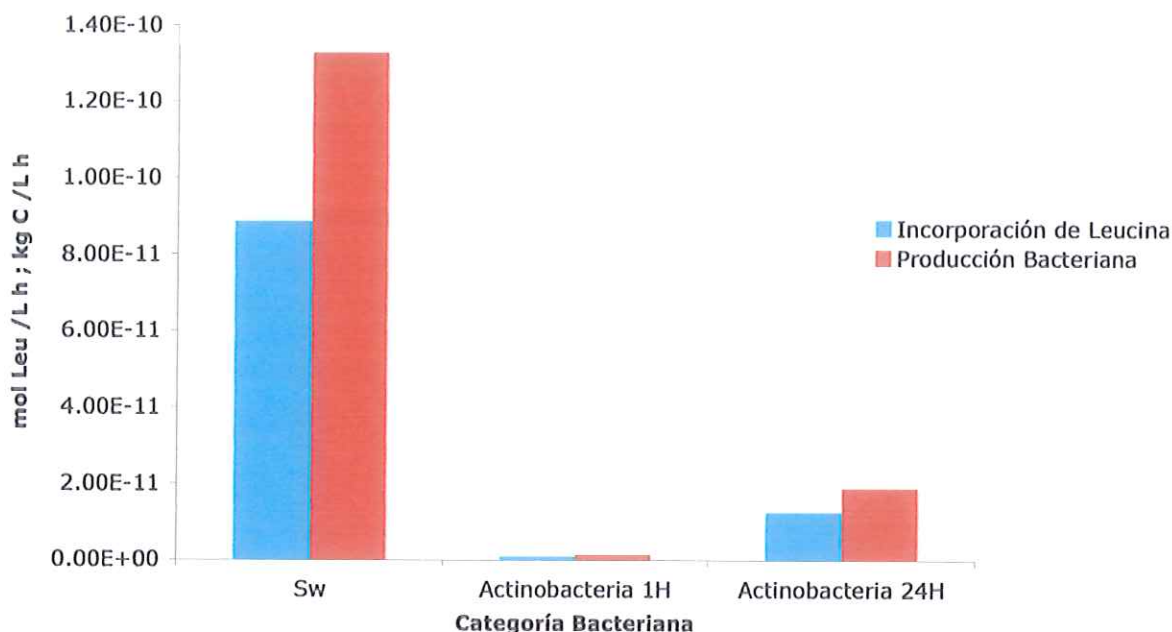


Figura 5. Histograma de la incorporación total de ^3H -Leucina en $\text{mol Leu L}^{-1} \text{h}^{-1}$ (rojo) y producción bacteriana total en $\text{KgC L}^{-1} \text{h}^{-1}$ (azul) para los diferentes tiempos de incubación (1 y 24h) de la cepa de actinobacteria S-178. Se muestra una comparación con los valores promedio de incorporación de leucina y producción bacteriana de una muestra de agua de mar del muelle del Instituto de Oceanografía de Scripps. Las barras que corresponden al tratamiento de 24h muestran la incorporación de ^3H -Leucina y producción bacteriana total del periodo de incubación.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS Y DNA

Se obtuvo la variación en la concentración de proteínas y DNA del cultivo bacteriano de la cepa de actinobacteria S-178 a lo largo de un periodo de incubación de 10 días.

La concentración de proteínas obtenida con el kit de cuantificación Micro BCA (Proteínas BCA), tuvo un valor inicial (t_1 del periodo de incubación del cultivo) de $12.2 \mu\text{g/mL}$ y un valor final (t_{10}) de $97 \mu\text{g/mL}$, equivalente a un incremento de proteínas total de $84.2 \mu\text{g/mL}$ (fig.6).

Con el método de 50% del peso seco (Simon y Azam, 1989) se obtuvo una concentración de proteínas, para el t_3 del periodo de incubación, de $39\mu\text{g/mL}$ y una concentración final (t_9) de $123.5\mu\text{g/mL}$, con un incremento de proteínas total de $84.5\mu\text{g/mL}$ (fig.6). Al comparar la concentración de proteínas para el t_3 se observan valores de 39 y $37.094\mu\text{g/mL}$ para el porcentaje de peso seco y de proteínas BCA respectivamente, lo cual equivale a una diferencia de $1.9\mu\text{g/mL}$. Para el tiempo t_9 esta diferencia incrementa a $30\mu\text{g/mL}$, con valores de 123.5 y $97\mu\text{g/mL}$ para el porcentaje de peso seco y de proteínas BCA, respectivamente. Sin embargo, el incremento total de proteínas obtenido con ambos métodos muestra una diferencia mínima de $0.3\mu\text{g/mL}$ (fig.6).

Con base en la cuantificación de DNA realizada con el kit PicoGreen se obtuvo una concentración de DNA para t_4 (lectura inicial de DNA) de $0.187\mu\text{g/mL}$ y una concentración final de $0.436\mu\text{g/mL}$, lo cual equivale a un incremento total de DNA de $0.248\mu\text{g/mL}$ (fig.6).

Se obtuvo la proporción entre la concentración de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) y la concentración de DNA ($\mu\text{g/mL}$). Aunque se observan variaciones en esta proporción con un valor mínimo de 1:175 (para t_4) y un máximo de 1:260 (para t_5), ésta tuvo un valor promedio aproximado de 1:200.

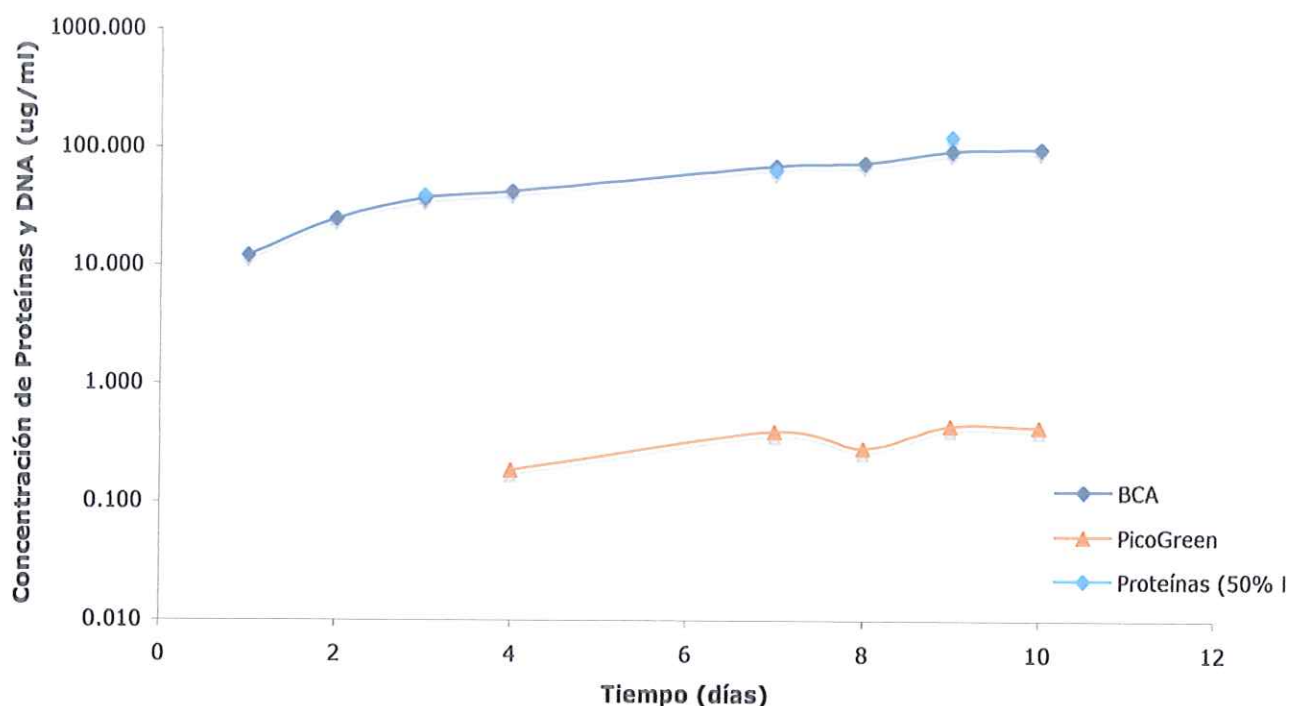


Figura 6. Variación en la concentración de proteínas y DNA en función al tiempo de incubación del cultivo bacteriano. Se utilizó una escala logarítmica en el eje de las ordenadas con fines comparativos entre los valores de concentración obtenidos. Se presentan las concentraciones de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) obtenidas con el kit MicroBCA (azul marino) y con base en el 50% de peso seco (azul), así como de DNA obtenidas con el kit PicoGreen (anaranjado).

Con base en la cuantificación de proteínas se realizó la estimación de una tasa de producción de carbono ($\text{kg C L}^{-1} \text{h}^{-1}$) para la cepa de actinobacteria a lo largo del periodo de incubación. Se calculó el incremento total en la concentración de proteínas a partir de la diferencia en el concentración inicial y final de proteínas. Se obtuvo un incremento de $84.812 \mu\text{g mL}^{-1}$ durante los 10 días de incubación, el cual puede ser expresado como $0.353 \mu\text{g mL}^{-1} \text{h}^{-1}$. Se consideró un factor de conversión de 10 fg C para calcular producción de carbono, para la cual se obtuvo un valor de $3.53 \times 10^{-6} \text{ kg C L}^{-1} \text{h}^{-1}$.

El valor de producción de carbono obtenido con base en la cuantificación de proteínas refleja una mayor actividad bacteriana en términos de productividad a diferencia de la actividad que se observa con base en los valores de producción de carbono obtenidos con el ensayo de incorporación de ^3H - leucina (tabla III).

La diferencia en los valores de producción de carbono obtenidos se puede deber a los siguientes factores: el valor obtenido con base en la cuantificación de proteínas refleja directamente el incremento de la concentración de carbono debido al aumento en la concentración de proteínas que es proporcional al incremento de la biomasa bacteriana.

Por el contrario el valor de producción obtenido con el ensayo de incorporación de ^3H -leucina, puede estar subestimado por el posible efecto de dilución del isótopo que ocurrió en el ensayo.

CURVAS DE CRECIMIENTO BACTERIANO

VOLUMEN CELULAR EMPACADO

Se observó una variación en el volumen celular empacado (PCV) a lo largo del periodo de incubación (10 días) de la cepa de actinobacteria S-178. Al inicio del experimento (t_1) se cuantificó un volumen de PCV promedio menor a $0.125\mu\text{L}$. A partir del t_3 se observó un incremento en el volumen mayor a $0.125\mu\text{L}$ y menor a $0.25\mu\text{L}$, este incremento se mantuvo de forma exponencial hasta llegar a un volumen de $1.25\mu\text{L}$ en un periodo de 3 días (t_6). Posterior a este tiempo (t_6) el aumento en el volumen celular empacado tuvo una menor

variación con una tendencia asintótica con un valor final de $2.25\mu\text{L}$ para t_{11} , se observó un incremento total de $2.125\mu\text{L}$ de volumen celular empacado (fig.7). El incremento del PCV se consideró proporcional al aumento en la concentración de células en el medio de cultivo dando como resultado la obtención de una curva de crecimiento.

Con base en las variaciones en el PCV se pudieron diferenciar tres diferentes etapas del crecimiento bacteriano en la curva de crecimiento obtenida. La primera fase, fase Lag, se considera ocurrió en los primeros 2 días de cultivo (t_1 - t_2) en donde el volumen cuantificado varió de forma mínima con una valor promedio de $0.125\mu\text{L}$. La fase exponencial comenzó a partir del tercer día de cultivo (t_3) con un valor de volumen inicial de $0.25\mu\text{L}$ y terminó al sexto día de cultivo (t_6) con un volumen de $1.25\mu\text{L}$. Posteriormente comenzó la tercera fase, fase estacionaria, la cual tuvo lugar entre el séptimo (t_7) y décimo (t_{11}) día de cultivo con un volumen de $1.5\mu\text{L}$ hasta $2.25\mu\text{L}$ (fig.7).

Se calculó la concentración celular (número de células por mililitro) con base en la cuantificación de proteínas, MicroBCA y 50% de peso seco, y con el volumen celular empacado (fig.8). De acuerdo a los valores de PCV se estimó una concentración celular inicial (t_1) de 1.25×10^8 células mL^{-1} y un valor de concentración final (t_{10}) igual a 2.25×10^9 células mL^{-1} . Con base en la concentración de proteínas BCA se estimó una concentración celular inicial (t_1) de 1.22×10^7 células mL^{-1} y un valor final (t_{10}) de 9.7×10^7 células mL^{-1} . Los valores de concentración celular estimados con el porcentaje de peso seco, tuvo

un valor inicial (t_3) de 7.8×10^7 células mL^{-1} y final (t_{10}) de 2.47×10^8 células mL^{-1} (fig.8).

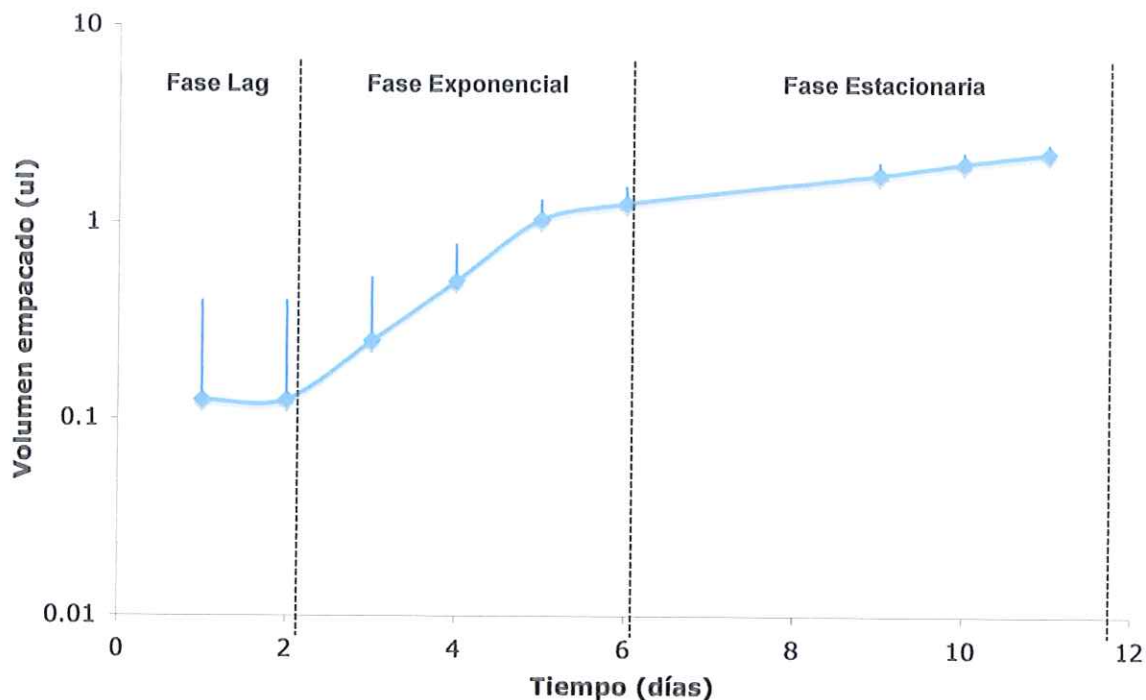


Figura 7. Variación en el volumen celular empacado (PCV) expresado en μL con respecto al tiempo de incubación del cultivo bacteriano (días). Se utilizó una escala logarítmica en el eje de las ordenadas con fines de apreciación detallada del incremento en la abundancia bacteriano con respecto al tiempo.

Se observan diferencias de al menos un orden de magnitud entre la concentración celular obtenida con los diferentes métodos (fig.8). La concentración celular inicial y final obtenida a partir de la concentración de proteínas por porcentaje de peso seco es mayor en ambos casos que los valores de concentración celular obtenidos de los valores de proteínas BCA. Existe una diferencia de 5.3×10^7 células mL^{-1} para el valor de concentración celular inicial y de 1.5×10^8 células mL^{-1} para el valor final.

Existe una diferencia de 5.3×10^7 células mL^{-1} para el valor de concentración celular inicial y de 1.5×10^8 células mL^{-1} para el valor final.

Con respecto a los valores inicial y final de concentración celular obtenidos a partir del volumen celular empacado, éstos son mayores en un o dos ordenes de magnitud respectivamente, para el valor de los obtenidos con base en la concentración de proteínas. La concentración celular inicial, obtenida del volumen celular empacado, es 5 veces mayor a la estimada con proteínas BCA y equivale a una diferencia de 1×10^8 células mL^{-1} . El valor de concentración celular final, obtenido con el volumen celular proteínas, resultó 23 veces mayor al valor estimado con proteínas BCA y es igual a 21.5×10^8 células mL^{-1} .

A diferencia de la curva de crecimiento obtenida con el volumen celular empacado, en las curvas estimadas con proteínas BCA y peso seco no fue posible hacer las divisiones correspondientes a las diferentes etapas del crecimiento bacteriano. Sin embargo, se puede apreciar un incremento en el número de células estimado a lo largo del periodo de incubación.

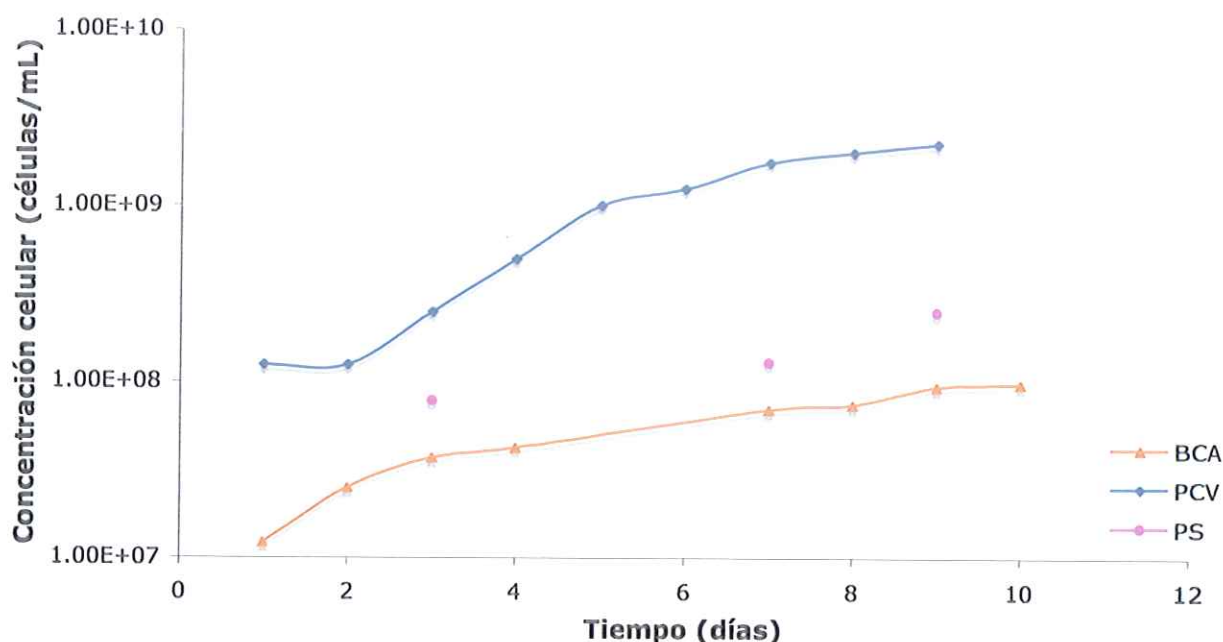


Figura 8. Variación en la concentración celular (número de células por mililitro) en función al tiempo de incubación del cultivo de la cepa S-178 (10 días). Se muestran tres diferentes curvas de crecimiento realizadas con base a la estimación del número de células por mililitro de acuerdo a los valores de concentración de proteínas obtenidos con el kit MicroBCA (anaranjado) y 50% de peso seco (rosa), así como con la variación en el volumen celular empacado (azul).

Con base en la diferencia en el número de células inicial y final calculado para las diferentes curvas de crecimiento obtenidas, se calculó la tasa de crecimiento y tiempo de duplicación promedio para el cultivo de actinobacteria. Para la curva obtenida con la cuantificación de proteínas BCA se estimó un valor de μ igual a 0.299d^{-1} y para g de 3.3 días. Los valores de estos parámetros calculados con base en la variación de PCV fue para μ de 0.289d^{-1} y g igual a 2.3 días. Los valores obtenidos muestran una diferencia mínima entre sí a pesar de la diferencia en el número de células calculado para cada método, por lo tanto ambos reflejan la cinética del cultivo bacteriano de igual manera.

De acuerdo a lo anterior existe un margen bastante restringido para la recuperación de estos microorganismos. Por esta razón resulta de gran importancia el uso de técnicas selectivas de cultivo como el uso de antibióticos y antimicóticos, que eviten el desarrollo de otros microorganismos con un crecimiento más rápido que las actinobacterias y que pudieran limitar su desarrollo en las condiciones de cultivo de laboratorio (Jensen *et al.*, 1991).

Por su importancia biotecnológica, los estudios de abundancia y diversidad de estos microorganismos resultan de gran relevancia al proveer de información invaluable respecto a la distribución de éstos en distintos ambientes marinos.

Actualmente es difícil hablar de diversidad y abundancia de un microorganismo sin considerar un análisis genético previo. Para cumplir con el objetivo de conocer la abundancia y distribución de especies bacterianas en una muestra representativa del medio ambiente, las herramientas moleculares son indispensables. La técnica más común para este fin es la secuenciación del rRNA o la amplificación del fragmento 16S rDNA (Jensen *et al.*, 2005; Maldonado *et al.*, 2005)

Los análisis genéticos permiten hacer estudios dirigidos y específicos sobre ciertos grupos bacterianos, sobre todo aquellos de importancia biotecnológica reconocida como las actinobacterias. Sin embargo, en el presente estudio no se contó con la disponibilidad de hacer este tipo de análisis. Por este motivo para poder hacer una "clasificación" preliminar que nos permitiera

priorizar el análisis de las cepas aisladas, se tomó en consideración las características morfológicas de las colonias.

Con base en la clasificación morfológica descrita por Bredholt *et al* (2008) y su dependencia del agua de mar para crecer se formaron tres grupos o tipos de actinobacterias, *Streptomyces*, *Micromonospora* y *Salinispora*. Este sistema de clasificación no nos asegura que las bacterias clasificadas dentro de un grupo por su morfología, genéticamente sean de los géneros antes mencionados.

Sin embargo, Jensen *et al* (1991) y Bredholt *et al* (2008) utilizan un sistema de clasificación inicial basado en la morfología de las cepas aisladas. Estudios genéticos posteriores mostraron una compatibilidad del 90 al 95% entre la clasificación morfológica y requerimientos de agua mar para su crecimiento con el análisis genético del 16S rRNA.

De forma general para los diferentes grupos de actinobacterias aisladas se obtuvo un mayor porcentaje de recuperación de los sedimentos de Bahía Concepción (75%) que con respecto a Bahía de los Ángeles (25%).

Se observó una clara tendencia en la obtención de grupos característicos de actinobacterias para cada sitio de muestreo. Se obtuvo una mayor recuperación de cepas tipo "Streptomyces" de las muestras de Bahía Concepción (96% del grupo). Por el contrario se observó un mayor número de cepas tipo "Micromonospora" y "Salinispora" en las muestras de Bahía de los Ángeles (80% del grupo).

Para explicar esta tendencia se deben considerar los algunos aspectos respecto a la naturaleza de las muestras como son: el tipo de muestra de sedimento, en función a la profundidad y distancia de la costa a la cual fueron tomadas y por lo tanto el tipo de sustrato en relación a su origen.

Los sedimentos de Bahía Concepción fueron colectados por buceo autónomo, por lo tanto son muestras someras (2m de profundidad máximo) y muy cercanas a la costa. El tamaño de grano de los sedimentos de Bahía Concepción es predominantemente de arenas gruesas, principalmente al sur de la bahía cerca de playa Santispac (de donde se obtuvo el 68% de este grupo de actinobacterias), en donde el material de origen terrígeno es abundante a causa de la descarga después de las lluvias de verano y el aporte eólico desde el continente (Rodríguez-Meza *et al*, 2009).

En diferentes estudios aún se discute el estado autóctono de este género de microorganismos en el medio marino. Se considera que la mayor abundancia de *Streptomyces* cultivables en sistemas marinos se ha encontrado en localidades cercanas a ambientes terrestres como ambientes costeros someros, y de comunidades de manglares y pastos marinos. Aún se desconoce si las cepas aisladas forman parte de la comunidad autóctona marina o si se han desarrollado a partir de esporas germinativas transportadas del medio terrestre (Jensen *et al.*, 1991; Takizawa *et al.*, 1993).

Se ha comprobado que diversos ejemplares terrestres de este género tienen una alta tolerancia a las sales y que bajo estas condiciones producen esporas resistentes que fácilmente podrían ser transportadas a ambientes

marinos, almacenarse y desarrollarse en este medio. Además, se ha observado un aparente decremento en la abundancia de *Streptomyces* cultivables al aumentar la distancia de la costa y la profundidad (Moran *et al.*, 1995; Jensen *et al.*, 1991; Weyland y Helmke, 1988; Okazaki *et al.*, 1976).

Con base en lo anterior podemos inferir que las actinobacterias del tipo *Streptomyces* encontradas en los sedimentos de Bahía Concepción pueden tener un origen terrígeno más se encuentran bien adaptadas a las condiciones de salinidad y otros factores físico-químicos del ambiente marino costero, lo cual se refleja en su abundancia en este medio.

Las muestras de sedimento de Bahía de Los Ángeles se colectaron con una draga a un máximo de 50m de profundidad y en estaciones alejadas de la costa. Los sedimentos de esta zona se caracterizan por ser más finos y se encuentran en un ambiente más estable y sin influencia directa terrígena (Fabián y Villalba, 1991).

En diferentes estudios se ha obtenido una mayor recuperación de cepas de actinobacterias pertenecientes al género *Micromonospora* en muestras colectadas a profundidades mayores a los 100m (Jensen y Mafnas, 2006; Maldonado *et al.*, 2005; Jensen *et al.*, 1991). Se ha reportado que diferentes cepas del género *Micromonospora* no requieren de agua de mar para su crecimiento y además son tolerantes a altas concentraciones de cloruro de sodio. Lo anterior implica que representantes de este género, incluyendo los aislados en este estudio, estén adaptados para vivir en ambientes costeros en donde el gradiente de salinidad puede variar considerablemente por diversos

factores ambientales, así como en ambientes profundos en donde las condiciones de salinidad tienden a ser constantes (Mincer *et al*, 2002; Jensen *et al*, 1991).

Se considera que el primero género de actinobacterias puramente marino es el *Salinispora*. Las tres especies hasta el momento encontradas se caracterizan por tener un estricto requerimiento de agua de mar para su crecimiento. Se ha reportado que *S. tropica* y *S. arenicola* presentan una distribución cosmopolita en el sedimento marino a profundidades mayores de 200m de las regiones tropical y subtropical del mundo (Jensen *et al.*, 2007; Jensen y Mafnas, 2006).

S. tropica y *S. arenicola* han sido aislados de sedimentos del Mar de Cortés (Golfo de California) (Jensen y Mafnas, 2006; Maldonado *et al.*, 2009), por lo que es probable que alguna de las cepas clasificadas como tipo *Salinispora* que mostraron una dependencia del agua de mar para crecer pertenezcan a este género.

Con base en lo antes mencionado se puede explicar la distribución y abundancia de los diferentes grupos de actinobacterias en los sitios de muestreo analizados de este estudio.

Debido a la interrogante que existe alrededor de la diversidad y abundancia de las actinobacterias en el medio marino, se considera que aún no se ha explorado todo el potencial del ecosistema marino como una fuente de diversidad microbiana de importancia económica. Por esta razón el uso de

técnicas de cultivo selectivas de detección y aislamiento es crucial para la recuperación de estos microorganismos (Maldonado *et al.* 2005; Bredholt *et al.*, 2007 ; Maldonado *et al.*, 2009). El éxito en la recuperación de diversos grupos de actinobacterias aumenta la probabilidad del descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios activos (Maldonado *et al.* ,2009 ; Baltz, 2007).

En este trabajo se decidió utilizar seis diferentes medios de cultivo suplementados con dos antibióticos y un antimicótico, se utilizó la técnica de estampado para la inoculación de las muestras. Se han propuesto diversas técnicas para aumentar el porcentaje de recuperación de las actinobacterias, las técnicas comúnmente utilizadas son el estampado y estampado + calor. Con el uso de estas técnicas se han obtenido porcentajes de recuperación de actinobacterias del 50 -70% (Mincer *et al.*, 2002 ; Jensen *et al.*, 2005b ; Maldonado *et al.*, 2005).

Respecto a los medios de cultivo, el uso de sustancias que inhiban el crecimiento de otros microorganismos con una velocidad de crecimiento mayor a las actinobacterias es de gran importancia. Sin embargo, la formulación de los medios de cultivo también tiene un papel importante en el intento por aumentar la recuperación de éstos. La actividad metabólica de un microorganismo en un medio de cultivo está en función de los nutrientes que contiene, su actividad determina su capacidad para crecer Maldonado *et al.* 2005; Bredholt *et al.*, 2007).

Los medios de cultivo utilizados en este estudio, formulados con algunos de los suplementos antes mencionados, mostraron porcentajes de recuperación

similares entre sí. Sin embargo, el medio M3 (almidón, peptonona y levadura) mostró el mayor número de cepas recuperadas, 53 cepas (22%). La formulación del medio M3 ha sido utilizada en diversos estudios en los cuales también presenta de los mayores porcentajes de recuperación y además permite el crecimiento adecuado de estos microorganismos.

Los medios M2 y M8, con manitol, tristona y casitona, aunque presentaron una recuperación similar a la de M3, no permitieron el desarrollo continuo de las actinobacterias aisladas. Lo anterior coincide con lo obtenido por Jensen *et al.* (2005b) y Mincer *et al.* (2002) en los que el medio a base de almidón, peptonona y levadura muestra de los mayores porcentajes de recuperación (60% del total de cepas aisladas) y además permite el cultivo de las actinobacterias aisladas.

En diferentes estudios los medios de cultivo de los cuales se obtiene un mayor porcentaje de recuperación de actinobacterias contienen en su formulación almidón, manitol, extracto de levadura, peptonona, quitina, caseína y novobiocina, principalmente (Mincer *et al.*, 2002; Jensen *et al.*, 1991, 2005b ; Maldonado *et al.*, 2005; Bredholt *et al.*, 2007, 2008). Generalmente estos suplementos se encuentran en bajas concentraciones con la finalidad de permitir el desarrollo de colonias de actinobacterias con la inhibición de otros microorganismos bajo estas condiciones. Sin embargo, medios de cultivo con una mayor concentración de nutrientes son necesarios para el desarrollo de cultivos de actinobacterias, ya que éstas parecen no ser capaces de seguir creciendo en condiciones oligotróficas (Jensen *et al.*, 2005b).

Considerando los criterios de las técnicas de cultivo selectivas para este grupo de microorganismos, es posible comparar los resultados de abundancia y aparente diversidad de actinobacterias aisladas de las zonas de muestro del Golfo de California. Es importante considerar que de los estudios a comparar, sólo uno es específico para la zona del Golfo de California, por lo que debido a la diferencia geográfica (latitud, longitud y distancia de la costa) y características específicas de cada sitio (temperatura, pH, etc.) se puede justificar de primera instancia las diferencias en la abundancia y diversidad de los grupos bacterianos presentes.

Estudios realizados desde Las Bahamas hasta el Golfo de California y Golfo de México, desde la trinchera de Japón y la Cuenca de las Canarias hasta los fiordos en Noruega, muestran la presencia de dos géneros de actinobacterias característicos del sedimento marino, *Micromonospora* y *Streptomyces*. En este caso el 70% de las actinobacterias aisladas se categorizaron del tipo *Streptomyces* mientras que el 30% restante fueron categorizadas del tipo *Micromonospora*. De este último grupo el 60% de las cepas se consideraron del tipo *Salinispora*.

Mincer *et al.* (2002) reporta para las Bahamas que un 90% de las actinobacterias aisladas pertenecen al género *Micromonospora*. Jensen *et al.* (2005b) para esta zona reporta un 65% para la familia *Micromonosporaceae* (88% del género *Salinispora* y 12% *Micromonospora*) y un 35% para el género *Streptomyces* y la familia *Thermonosporaceae*. Maldonado *et al.* (2005) para la región de la Cuenca de Canarias, la trinchera de Japón y fiordos de Noruega,

reporta en general una mayor abundancia de las familias *Streptomycetaceae* y *Thermonosporaceae*. Sin embargo, Bredholt *et al* (2008) para la zona de fiordos en Noruega reporta tres géneros principalmente, *Micromonospora* (21.3%), *Verrucospora* (0.7%) y *Streptomyces* (78%).

Maldonado *et al.* (2009) para la zona del Golfo de California reporta la presencia de diversos géneros de actinobacterias. En total aisló 200 cepas en las cuales encontró al menos un grupo de los siguientes géneros (no menciona el porcentaje de cada género): *Verrucospora*, *Micromonospora*, *Salinispora*, *Streptomyces*, *Nanomuraea* y *Solwaraspora*.

En el trabajo antes mencionado, Maldonado *et al.* colectaron las muestras de sedimento a 300m de profundidad promedio, y no utilizaron medios de cultivo y técnicas de aislamiento convencionales. Algunos de los medios utilizados fueron: Czapek-Dox (Weyland, 1969), GYEA (Gordon y Mihm, 1962), ISP-2, Basal suplementado con sales (Duangmal *et al.* 2005), SM3 (Tan *et al.* 2006) entre otros. La técnica de inoculación que utilizó fue a base de diluciones a partir de una suspensión de los sedimentos, inoculó 100µL por placa.

Con base en lo anterior se puede decir que el uso e implemento de técnicas de cultivo permite aumentar diversidad de actinobacterias recuperadas de muestras de sedimento. Si bien es cierto que existen grupos de actinobacterias dominantes en el sedimento marino, aún no podemos estar seguros que se han aislado todos los representantes de cada grupo.

Debido a que no se realizó una estimación de la concentración de bacterias heterotróficas viables cultivables no se puede establecer una

proporción y extrapolación de la comunidad de actinobacterias en los sitios de muestreo. Por lo que la recuperación de éstas representa para este estudio un panorama general de la diversidad de los grupos cultivables (*Micromonospora*, *Salinispora* y *Streptomyces*) en función a los medios y técnicas de cultivo utilizados, de los sedimentos del Golfo de California.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA

El potencial bioactivo de las actinobacterias clasificadas dentro del grupo *Streptomyces* en este estudio no fue probado. Debido a su reciente relevancia biotecnológica se decidió dirigir en prioritariamente el análisis de las cepas tipo *Micromonospora* y en especial del tipo *Salinispora*.

Sin embargo, por sus antecedentes se sabe que el género *Streptomyces* es una fuente de diversos metabolitos secundarios con actividad biológica (Fenical y Jensen, 2006; Challis y Hopwood, 2003), principalmente antibióticos. Recientemente se ha propuesto el nuevo género "*Marinispora*" de estreptomicetos marinos, los cuales han mostrado ser productores de nuevos compuestos bioactivos.

A partir de las actinobacterias pertenecientes a este nuevo grupo marino se han aislados los compuestos llamados marinomicinas con actividad antitumoral (citotóxica) y antibiótica. La marinomicina A en estudios realizados por el Instituto Nacional del Cáncer en Estados Unidos presentó una alta actividad citotóxica contra seis líneas celulares, la mayor actividad reportada fue contra el melanoma SK-MEL-5 a una concentración de 5.0 nM. Este compuesto

también mostró actividad contra el patógeno MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina) a una concentración mínima inhibitoria de 0.1 μ M (Jensen y Fenical, 2006).

Otros compuestos aislados a partir de este grupo son el Marinisporalide A y B, de los cuales aún se realizan distintas pruebas de actividad citotóxica y antibiótica. Hasta el momento han mostrado una importante actividad antifungal contra *Candida albicans* resistente a amfotericina (Jensen y Fenical, 2006 ; Mincer *et al.*, 2002).

Aunque el potencial bioactivo de las cepas tipo *Streptomyces* aisladas de Bahía Concepción y Bahía de Los Ángeles aún permanece desconocido, se sabe existe una alta probabilidad de encontrar compuestos con actividad antibiótica y citotóxica. Por esta razón resulta conveniente sugerir la realización de estudios futuros que exploren dicha actividad a partir de la colección de estas cepas.

Con base en los resultados de las pruebas de actividad biológica realizadas para las actinobacterias de los grupos *Micromonospora* y *Salinispora* aisladas en este estudio, se puede considerar que el Golfo de California (específicamente las zonas de Bahía Concepción y Bahía de Los Ángeles) es un reservorio de actinobacterias bioactivas.

El hecho de que el 30% de los extractos probados resultaran activos para al menos una línea celular en los ensayos de citotoxicidad y un patógeno es una prueba del potencial antes mencionado. Las actinobacterias de la familia *Micromonosporaceae* a la cual pertenecen los géneros *Micromonospora* y

Salinispora, se caracterizan por ser importantes productores de sustancias bioactivas. Las cepas de estos géneros aisladas del medio marino han mostrado una alta tasa de actividad antitumoral como el salinosporamide A del género *Salinispora*, y las rifamicinas de *Micromonospora* (Eccleston, 2008 ; Jensen y Fenical, 2006; Feling *et al*, 2003).

La actividad de amplio espectro (actividades no específicas) se puede explicar desde dos diferentes puntos de vista principalmente: 1) La mezcla de compuestos encontrada en los extractos crudos obtenidos, y 2) El tipo de compuestos aislados por las técnicas de extracción utilizadas.

Los extractos crudos se caracterizan por ser una mezcla de compuestos que fueron extraídos por su afinidad química bajo un mismo tratamiento de extracción. Por ejemplo, Rusnak *et al.* (2001) ha reportado el aislamiento de una mezcla de compuestos aromáticos con actividad antibiótica contra bacterias Gram-positivas, similares a la gentamicina, producidas por diferentes especie de *Micromonospora*.

Por lo tanto al tratarse de una mezcla de compuestos la actividad que observamos puede deberse a un efecto sinérgico entre los diferentes compuestos, la actividad de un compuesto puede ser contrarestada por efecto de otro(s) o bien ésta puede deberse a un único compuesto en específico (Challis y Hopwood, 2003). Para poder definir el origen de la actividad de un extracto crudo es necesario hacer la separación de los compuestos de la mezcla por métodos químicos como la cromatografía en columna y cromatografía líquida

de alta resolución (HPLC). Una vez que se obtienen las fracciones puras de los compuestos de la mezcla se prueba la actividad de cada una.

Las actividades reportadas en este trabajo se consideran altas para la concentración manejada en los bioensayos realizados (20µg/mL), si se toma en cuenta que se probaron extractos crudos y que generalmente un compuesto puro se considera activo a partir de una concentración de 10mg/mL. Desafortunadamente en este caso no se realizó una curva de dosis letal media (IC₅₀) o de concentración mínima inhibitoria (CMI) en la que se pudiera explorar el margen de actividad de los extractos, y no se realizó una separación y purificación de los compuestos del extracto crudo para la realización de ensayos de actividad.

Debido a que no se cuenta con un valor de CMI o IC₅₀, y una elucidación química de los compuestos obtenidos la comparación con otros trabajos resulta difícil, ya que generalmente en la literatura la actividad biológica se reporta en función a los valores de dichas concentraciones y no en porcentaje de sobrevivencia celular, y además se muestran las estructuras de los compuestos aislados. Sin embargo, en algunos trabajos reportan el porcentaje de cepas que resultaron activas en los bioensayos probados.

Mincer *et al* (2002) reporta que el 86% de los extractos de actinobacterias del género *Micromonospora* analizados (105 en total) mostraron actividad contra la línea celular de cáncer de colon HCT-116 con un valor de CMI de 16.4µg/mL, y el 30% de los extractos tuvieron actividad antibiótica contra *Candida albicans* (ARCA) y *Enterococcus faecium* (VREF), con un valor de CMI de 19.5µg/mL y

25µg/mL, respectivamente. En este caso el 30% de los extractos probados mostraron actividad citotóxica contra células MCF7 (cáncer de mama) y HeLa (cáncer de cerviz) a una concentración de 20µg/mL, mas ninguno mostraron actividad contra *Candida albicans* también probada en este estudio.

Eccleston *et al* (2008) reporta que el 16.9% de las cepas del género *Micromonospora* (75 en total) probadas contra *Staphylococcus aureus* mostraron actividad antibiótica. Bredholt *et al* (2008) también reporta actividad antibiótica para extractos de actinobacterias del género *Micromonospora*, para *C. Albicans* el 39% de los extractos mostraron actividad. En este estudio se probaron seis patógenos, entre ellos *C. Albicans*, y sólo tres de éstos mostraron actividad antibiótica contra la cepa MRSA.

Como se mencionó anteriormente, si se consideran las técnicas de extracción de compuestos utilizadas en el presente trabajo y se comparan con estudios previos, se pueden explicar las distintas actividades observadas. Un factor importante a considerar es el solvente utilizado en la extracción. Cada solvente tiene una polaridad específica que al mezclarse con otras sustancias (en este caso los compuestos del medio de cultivo) su afinidad química estará dada por la similitud en sus polaridades. De esta manera la selección del solvente a utilizar es crucial para extraer un tipo de compuesto en particular.

El proceso de extracción define indirectamente la actividad de los compuestos. Cuando se habla de actividad se debe pensar a nivel molecular en el que sólo existe una molécula con las características estructurales químicas

únicas que es capaz de reaccionar con otras moléculas a nivel de membrana celular e incluso a nivel genético. Es decir, si la molécula de un compuesto X interfiere en el sitio activo de una enzima la ruta metabólica de algún proceso celular se vería interrumpido y posiblemente lleve a la muerte de la célula. Esta interacción se verá reflejada como una actividad antibiótica o citotóxica.

Por ejemplo, el slinosporamide A fue extraído con una resina de amberlita XAD-16 y eluido con acetona (Feling *et al*, 2003). Su arreglo estructural único le confiere un alto grado de actividad biológica debido a su afinidad molecular para unirse al proteosoma 20S. Este compuesto se une de manera covalente al sitio activo de la treonina, este desplazamiento transforma totalmente el arreglo químico inicial de la molécula del proteosoma 20S y la deshabilita por completo, lo cual inhibe completamente procesos de regulación y degradación de proteínas en la célula (Feling *et al*, 2003 ; Groll *et al*, 2006) .

Con base en lo anterior se puede explicar la diferencia en la actividad de las fracciones de los extractos (polar y no polar) y la actividad contra diferentes tipos de células (microbianas o cancerígenas). Se observó que los extractos en su fracción no polar (acetato de etilo) mostraron una mayor actividad citotóxica, mientras que la fracción polar (metanol) no mostró esta actividad.

De acuerdo con lo anterior se puede inferir que los compuestos extraídos con acetato de etilo tienen una mayor afinidad por los compuestos celulares, de tal manera que pueden interactuar entre sí y mostrar una actividad determinada. De esta manera es posible explicar el hecho de que algunos extractos mostraran actividad citotóxica mas no antibiótica. Si los compuestos extraídos con acetato

de etilo mostraron afinidad con alguno de los componentes extra o intra celulares de las células de cáncer, entonces se pudo observar una actividad citotóxica. Sin embargo, esto no significa que los compuestos deberían también ser afines a los componentes celulares de lo patógenos y viceversa.

La obtención de compuestos activos con el uso de acetato de etilo como solvente de extracción ha sido reportado en estudios previos (Jensen *et al.*, 2007; Mincer *et al.*, 2002). Los compuestos obtenidos con esta técnica de extracción se aislaron a partir de cultivos de los géneros *Micromonospora* y *Salinispora*, y mostraron tener actividad antibiótica contra *Candida albicans*, *Enterococcus faecium* y la línea celular de cáncer de colon HCT-116.

De acuerdo a lo antes mencionado es probable que la fracción de acetato de etilo de los extractos de este estudio también presentaran actividad antibiótica. La actividad citotóxica observada en los resultados de este trabajo y en los estudios antes mencionados, permite comprobar que el uso de este solvente también favorece a la extracción de compuestos con actividad citotóxica.

Por lo tanto, con respecto a la actividad biológica se puede decir que además de que ésta se encuentra definida por le tipo de compuestos que fueron aislados con un método de extracción específico, también es relativa al tipo de células contra las que se esta probando esta actividad.

Como se muestra en la descripción de los resultados de actividad biológica, el 90% de los extractos que mostraron actividad citotóxica fueron

obtenidos a partir de actinobacterias del tipo *Salinispora*. Las cepas pertenecientes a este género son una fuente prolífica de metabolitos secundarios con una amplia diversidad estructural. Se ha reportado que el 80% de éstas muestran actividad antitumoral y un 35% actividad antibiótica (Jensen y Fenical, 2006).

Se ha demostrado que sin importar el origen geográfico de las cepas *Salinispora*, la producción de compuestos activos tiene un patrón bien definido. Todas las cepas de *S. tropica* se caracterizan por producir los mismos dos compuestos: salinosporamide A (inhibidor del proteosoma) y sporolide A cuya actividad biológica aún no ha sido probada. Las cepas de *S. arenicola* producen compuestos de las familias de la rifamicina (antibiótico) y staurosporina (inhibidor de la protein-kinasa), además del nuevo compuesto salinicetal (antibiótico) (Jensen *et al.*, 2007).

Si las cepas clasificadas en este estudio como pertenecientes al género *Salinispora* corresponden genéticamente a alguna de las especies descritas para este género, entonces su actividad de amplio espectro observada en los ensayos de actividad biológica se encuentra justificada por los patrones de producción de compuestos activos que poseen las especies de *Salinispora*. En ese caso, sería muy probable que la actividad observada fuera dada por la presencia de alguno de los compuestos mencionados anteriormente en los extractos probados.

Conocer las especies de actinobacterias presentes en el medio, con base en su secuenciación genética, permite dirigir el esfuerzo técnico a especies objetivo de interés para explorar su potencial actividad biológica.

CURVAS DE CRECIMIENTO BACTERIANO

Los resultados de producción bacteriana, tasa específica de crecimiento y tiempo de duplicación obtenidos con base en el ensayo de incorporación de ^3H -Leucina, sugieren que esta técnica no resultó la mejor aproximación para estimar los parámetros antes mencionados.

El desarrollo de esta técnica con cultivos de actinobacterias en laboratorio no se había llevado a cabo anteriormente. Originalmente esta técnica fue propuesta para estimar la producción bacteriana en ambientes acuáticos en donde la concentración de este aminoácido es mínima ($<1\text{nM}$) (Kirchman *et al.*, 1985 ; Simon y Azam, 1989).

Normalmente en la realización de los ensayos se utiliza una concentración de 20nM que es mucho mayor a la concentración *in situ*. La alta concentración añadida tiene dos efectos, primero, en presencia de una alta concentración de leucina las bacterias asimilan el aminoácido exógeno y por lo tanto la biosíntesis de leucina natural es reprimida.

Esta técnica considera diversos factores que pueden influir directamente en el valor de las estimaciones. El primero es el efecto de dilución isotópica (DI) que se debe a la posible biosíntesis de leucina aún en la presencia de la exógena, la aproximación más conservadora considera un valor de DI igual a 1.

El segundo factor es factor de conversión (FC) que se utiliza para estimar la biomasa celular en gramos de carbono por célula.

En este caso los valores de DI y FC reportados en la literatura no eran aplicables al tipo de estudio que se realizó en este trabajo, debido principalmente al uso de un medio de cultivo enriquecido para el cultivo de una cepa bacteriana específica. La prueba que se realizó y los cálculos realizados se basaron en los principios de la técnica establecidos por Smith y Azam (1992).

El principal inconveniente de utilizar valores de DI y FC no específicos para las condiciones de cada ensayo es que los resultados obtenidos pueden ser una subestimación o sobrestimación del valor de los parámetros. Los resultados del ensayo realizado resultaron ser una subestimación de la productividad, tasa específica de crecimiento y tiempo de duplicación de la cepa de actinobacteria analizada.

El problema que representa utilizar un medio de cultivo enriquecido es precisamente su alta concentración de nutrientes, entre ellos aminoácidos y proteínas. El medio de cultivo utilizado contiene en su formulación peptona, cuyo valor nutricional es su contenido de aminoácidos como fuente de nitrógeno para las bacterias. Sin embargo, la proporción y concentración de cada aminoácido no se pudo cuantificar previo a la realización del ensayo.

Debido a estas condiciones es muy probable que haya ocurrido un problema de dilución (DI) de la leucina marcada (^3H -Leu) en el medio de cultivo rico en aminoácidos (incluyendo leucina). Al encontrarse en menor o igual cantidad que el resto de los aminoácidos, la probabilidad de que las bacterias

asimilaran específicamente ^3H -Leu fue mínima y por lo tanto su incorporación. De esta forma su baja tasa de incorporación no es resultado de una baja productividad bacteriana sino por el efecto de dilución que se presentó.

La estimación adecuada de productividad bacteriana (y los parámetros derivados de ésta) con el uso de esta técnica en medios de cultivo bacterianos es crucial la realización de curvas de saturación de leucina. De esta forma la cantidad de ^3H -Leucina añadida al medio de cultivo será suficiente para asegurar que ésta sea asimilada por las bacterias preferentemente.

Otra alternativa para la realización del ensayo de incorporación de leucina en cultivos bacterianos es el uso de medios de cultivo cuya formulación no incluya fuentes de nitrógeno como aminoácidos. Tibbles (1996) utilizó la incorporación de ^3H - leucina y ^3H - Timidina en cultivos de bacterias aisladas de distintos habitats marinos. En su estudio las cepas bacterianas fueron inoculadas en un medio de baja concentración de nutrientes que no contiene aminoácidos (minimal médium M9).

Se ha reportado que las actinobacterias en medios de cultivo no enriquecidos resultan ser no activas metabólicamente y por lo tanto no crecen (Jensen *et al.*, 2005b). Sin embargo, existen otros medios de cultivo enriquecidos sin aminoácidos (Mincer *et al.*, 2002; Jensen *et al.*, 2005) de los que se han recuperado diferentes cepas de actinobacterias, que pudieran ser factibles para el uso de este tipo de técnicas posteriormente.

Los factores de conversión reportados en diferentes estudios están calculados para células bacterianas con características específicas. El FC

reportado por Simon y Azam (1989) y Kirchman (1992) fue de 1.5 a 3 kgC mol Leu⁻¹ y 0.108×10^{18} células mol⁻¹ y está definido para células bacterianas de 0.026 a 0.4 μm. Jorgensen (1992) y Baath (1994) definen un factor de conversión promedio de 6.8×10^{16} células mol⁻¹ para células con un tamaño $\leq 10 \mu\text{m}^3$. Para las células de actinobacterias no se encontró un factor de conversión específico y no se calculó alguno con base en su tamaño.

Su forma de crecimiento dificultó la diferenciación de células independientes para la medición de su tamaño y para el conteo de número de células directo. Por este motivo los cálculos de la biomasa celular fueron realizados con los factores de conversión reportados y con el número de células aproximado estimado con la cuantificación de proteínas realizada. Debido a que los valores de las variables utilizadas no fueron calculados de forma específica para el tipo de bacterias analizadas existe una gran incertidumbre en los resultados obtenidos.

Estudios de incorporación de leucina y timidina realizados en comunidades microbianas del sedimento marino reportan tiempos de generación promedio de 3.7 días (Baath, 1998) y 5.3 días (Dixon y Turley, 2001). Los resultados que se esperaban obtener eran valores similares a lo reportado *in situ*, considerando que existía actividad metabólica a pesar de la diferencia en la composición química del medio de cultivo y de las condiciones físicas de cultivo con respecto a las encontradas en el medio natural. Sin embargo, los tiempos de generación obtenidos de 10 y 38 días no corresponden incluso a las

observaciones a simple vista del incremento en la masa celular del cultivo en el laboratorio.

Como consecuencia de la serie de inconvenientes metodológicos los resultados obtenidos de productividad, tasa de crecimiento específica y tiempo de duplicación obtenidos por la técnica de ^3H - Leucina no resultan verídicos para definir los parámetros de eficiencia de crecimiento de la cepa de actinobacteria utilizada en este trabajo.

Las técnicas alternas utilizadas para la obtención de las curvas de crecimiento de la cepa modelo resultaron más eficientes para la estimación de la tasa de crecimiento específica (μ) y tiempo de duplicación o generación (g). Aunque para la conversión de concentración de proteínas y volumen celular empacado (PCV) a número de células por mililitro se utilizó como factor el peso y volumen total por célula de *E. Coli* , los resultados obtenidos tienen una aproximación más verídica a los valores esperados.

Las diferencias que se observan en el número de células calculado a partir de la concentración de proteínas y PCV, están dadas precisamente por los factores de conversión utilizados. Para la conversión de PCV se consideró un volumen de 1pL por célula, mientras que para proteínas fue de 1pg. Sin embargo, a pesar de la diferencia en el número final de células los valores obtenidos de μ (0.289 d^{-1} y 0.299 d^{-1} , respectivamente) y g (2.3 y 3.3 días) no resultan muy diferentes entre sí.

Estos valores de tiempo de duplicación (tasa específica de crecimiento implícita) no difieren de los reportados para comunidades de sedimento con un valor mínimo de 2.3 y máximo de 5.3 días (promedio de 3.7 días) (Pace *et al.*, 1990; Baath, 1998; Dixon y Turley, 2001). Ya que los resultados obtenidos están dentro del intervalo observado *in situ* para comunidades del ambiente en donde se encuentran las actinobacterias y coincide con las observaciones realizadas en laboratorio, se puede decir que estos valores reflejan la cinética real del cultivo bacteriano analizado.

La obtención de estos valores permite comparar el crecimiento de estos microorganismos con otros y constatar de forma cuantitativa su velocidad de crecimiento. Muestras de agua de mar del Pacífico Norte Central se han estimado valores de μ igual a $0.25d^{-1}$ y para g de 2.7días (Church *et al.*, 2000), otros estudios han reportado para el agua de mar valores para μ de $0.45d^{-1}$ y para g igual a 1.4días (Smirga com.pers.). Comparado con los valores antes mencionados, la tasa de crecimiento y tiempo de generación calculados se encuentran dentro de mismo intervalo de valores por lo que se podría pensar que las actinobacterias no crecen más lento que lo esperado en el ambiente natural (sedimento y columna de agua).

Sin embargo, generalmente las cepas bacterianas en condiciones de laboratorio tienen tasas de crecimiento mayores y tiempos de duplicación más rápidos que lo que se observa *in situ*. Cepas aisladas de agua han mostrado tasas de crecimiento promedio de $0.25h^{-1}$ y tiempos de duplicación de 2.7h en condiciones de laboratorio (Kemp *et al.*, 1993). *E.coli* y *S.aureus* tienen tiempos

de duplicación de 20-30 minutos, la cepa TW7 aislada del medio marino (del laboratorio del Dr. Azam) tiene un tiempo de duplicación de 4h y una tasa de crecimiento de $0.15h^{-1}$ (Smirga com.pers.).

Al comparar las curvas de crecimiento de la cepa TW7 (datos no mostrados) con la obtenida con el volumen celular empacado para la cepa de actinobacteria, se observa la gran diferencia en los periodos de duración de cada una de las fases de crecimiento. La cepa de actinobacteria presentó un fase Lag de 2.5 días mientras que la TW7 fue de 10h aproximadamente. La fase exponencial de TW7 tuvo una duración de 18h y la de la cepa de actinobacteria fue de 4días, posterior a esta fase se observó para ambas la fase estacionaria.

En comparación con los ejemplos antes mencionados las actinobacterias muestran una velocidad menor de crecimiento, lo cual puede estar dado por una disminución en la actividad metabólica (por la composición del medio y condiciones de cultivo) o porque verdaderamente su velocidad de crecimiento si es menor a la de otros microorganismos.

El análisis comparativo en el incremento de la concentración de proteínas con respecto a la de DNA indica que posiblemente la velocidad de crecimiento observada este justificada en la manera en la que estos microorganismos se desarrollan. Se obtuvo una proporción de DNA:Proteínas de 1:200 y generalmente esta proporción es de 1:20 (Marr, 1991), este incremento indica que posiblemente la células de actinobacterias tienden a crecer principalmente en tamaño (desarrollo de filamentos radiales) que en número de células (y replicaciones del genoma). Este comportamiento está descrito de manera

general en la descripción de este grupo bacteriano (Challis y Hopwood, 2003; Hopwood, 2004; Davies, 2004).

Si lo descrito anteriormente tanto en los parámetros que describen la velocidad de crecimiento de la célula (tasa específica de crecimiento y tiempo de duplicación) como en la estrategia de crecimiento de estos microorganismos (aumento en masa por el desarrollo de filamentos radiales) reflejan en realidad el comportamiento de las actinobacterias *in situ*, entonces su estrategia combativa como la producción de compuestos bioactivos está justificada por su estrategia de crecimiento.

DISCUSIÓN GENERAL

La bioactividad que puede presentar un microorganismo es apreciada en primer término por su potencial aprovechamiento en el área de la farmacología. Generalmente el esfuerzo en la obtención de nuevos compuestos activos radica en la necesidad existente del descubrimiento de nuevos fármacos que ayuden al tratamiento de los diferentes padecimientos que afectan a la salud pública.

Sin embargo, desde un punto de vista ecológico la producción de compuestos activos o metabolitos secundarios también tiene gran relevancia. En este ámbito tienen lugar las siguientes preguntas, Qué son los metabolitos secundarios?Cuál es su significado evolutivo? Por qué las actinobacterias son productores prolíficos de éstos? (Challis y Hopwood, 2003).

Para poder comprender las preguntas anteriores es necesario comprender las características del ambiente bajo el cual estos microorganismos se desarrollan. El habitat clásico de una actinobacteria marina se ubica en el sedimento, en donde existe una gran variedad de fuentes de alimento como azúcares simples, carbohidratos y compuestos nitrogenados como proteínas. En este medio también se encuentran expuestas a otras variables como temperatura, pH, presión, disponibilidad de oxígeno y la presencia de otros microorganismos que representan competencia o bien posibles simbioses (Hopwood, 2004).

En un medio complejo y hostil como el sedimento en el que el estrés ambiental ocurre de forma variable en espacio y tiempo, los microorganismos sésiles como las actinobacterias el estrés no puede ser evadido. Esta necesidad

de enfrentar el estrés podría ser la explicación de la producción de compuestos activos y del tamaño de su genoma que codifica para diversos genes reguladores, proteínas de transporte y enzimas nutricionales (Bentley *et al.*, 2002; Challis y Hopwood, 2003; Hopwood, 2004).

Las características anteriores conferirían a las actinobacterias una ventaja selectiva que asegurara su sobrevivencia en el medio ambiente del sedimento. La importancia adaptativa de los metabolitos secundarios se ve reflejada en la complejidad genética de su biosíntesis y en la diversidad de compuestos que actúan contra distintos objetivos (Challis y Hopwood, 2003 ; Hopwood, 2004; Udvary *et al.*, 2007).

El genoma de *Streptomyces coelicolor* consta de 8,667,507pb, es una molécula lineal del doble de tamaño con el doble del número de genes que bacterias como *Bacillus subtilis*. Se ha comprobado que aproximadamente un octavo de sus genes son reguladores y éstos se activan en respuesta a estímulos específicos. A estos genes se les ha conferido la facultad adaptativa de la producción de metabolitos secundarios principalmente (Hopwood, 2004).

La secuenciación del genoma de *Salinispora tropica* muestra que está compuesto por 5,188,331 pb y revela la presencia de grupos de genes involucrados en la producción de metabolitos secundarios, incluso de aquellos cuyos productos no han sido aislados con el proceso de fermentación tradicional (Udvary *et al.*, 2007).

La información que proveen las técnicas moleculares permite la realización de ensayos de cultivo (fermentación) guiados por la expresión genética. Específicamente la secuenciación genética es una herramienta trascendental para el aprovechamiento del potencial biotecnológico de estos microorganismos.

Existe una gran diferencia entre la actividad que muestras estos organismo *in situ* a la que se observa en el laboratorio. El aislamiento e identificación de antibióticos (y otros compuestos activos) requiere de la obtención de una mínima cantidad de compuesto producido por un microorganismo en un ambiente extraño.

El espectro de actividad biológica de estos metabolitos secundarios de forma natural podría ser desde la inhibición o aniquilación de otros microorganismos (antibióticos) e incluso con efectos tóxicos contra otro tipo de organismos. Incluso se ha propuesto su función como sustancias hormonales que permiten la diferenciación microbiana (Challis y Hopwood, 2003).

Bajo las condiciones de cultivo en laboratorio el metabolismo celular se ve perturbado lo cual resulta en una sub o sobre expresión de las funciones normales del microorganismo. La respuesta a este fuerte estrés fisiológico es la producción de metabolitos secundarios. Sin embargo, no hay que olvidar que éstos finalmente son producidos debido a que estos microorganismos poseen la maquinaria bioquímica para elaborarlos (Davies, 2006).

Con base en los argumentos antes mencionados se puede explicar el posible origen de la producción de los compuestos o metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica reportada en este trabajo. De igual manera es factible pensar que bajo distintas condiciones de cultivo es probable favorecer la expresión de otras rutas metabólicas que deriven en la producción de nuevos compuestos que pudieran presentar actividad biológica.

Ante cualquier escenario en laboratorio no se debe olvidar que los procesos que ocurren realmente en las comunidades microbianas no se pueden reproducir en su totalidad en cajas petri. Esto implica comprender que la actividad biológica, metabólica y expresión genética observada en el laboratorio no necesariamente será la misma que se presenta *in situ*. Sin embargo, ésta sigue siendo la mejor aproximación que tenemos para comprender el comportamiento de las comunidades microbianas.

Las comunidades microbianas existen en la naturaleza bajo complejas condiciones de solidaridad biológica e interdependencia debido a las redes de señales químicas a base de diversos tipos de moléculas. El esfuerzo en la comprensión de estos procesos será de gran importancia para el avance de la ciencia e indispensable para cubrir las necesidades de la farmacología.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron 235 cepas de actinobacterias, 166 del tipo *Streptomyces* aisladas en su mayoría de Bahía Concepción, 27 del tipo *Micromonospora* y 42 del tipo *Salinispora* aisladas principalmente de Bahía de los Ángeles.

La actividad citotóxica contra las líneas celulares de cáncer de mama (MCF7) y cérvico (HeLa) se observó principalmente en la fracción no polar de 14 extractos de cepas tipo *Salinispora*.

Los valores de actividad más altos observados fueron del 20% contra MCF7 por las cepas S-365 y S-355, 24% contra HeLa por la cepa S-165 y 25% contra MCF7 (S-361) y HeLa (S-361 y S-353).

Ninguna de las fracciones polares mostró actividad citotóxica contra alguna de las líneas celulares probadas.

Ninguno de los extractos en su fracción polar y no polar tuvo actividad citotóxica contra la línea de cáncer de pulmón H460 y como activador o bloqueador de los canales de sodio.

Las fracciones polares de 3 extractos tuvieron actividad antibiótica contra el patógeno MRSA.

Los valores de actividad más altos contra el patógeno MRSA fue de 3 y 6% por los extractos de las cepas S-370 y S-369, respectivamente.

No se pudo obtener un valor de productividad bacteriana, tasa de crecimiento específica y tiempo de duplicación con base en el ensayo de incorporación de ^3H -Leucina realizado.

Los valores estimados para la tasa de crecimiento específica fueron de 0.207- 0.289 d^{-1} de acuerdo a los resultados de cuantificación de proteínas y volumen celular empacado, respectivamente.

Los valores de tiempo de duplicación calculados fueron de 2.3 y 3.3 días con base en la cuantificación de proteínas y volumen celular empacado, respectivamente.

La técnica de volumen celular empacado resultó ser la mejor aproximación para la obtención de una curva de crecimiento para la cepa de actinobacteria utilizada.

Con base en la proporción de DNA: Proteínas observada se considera que estos microorganismos tienden a crecer en volumen (masa celular) mas que en número, al menos bajo las condiciones de cultivo utilizadas.

Con base en los valores de tasa de crecimiento específica y tiempo de duplicación reportados, se considera que las actinobacterias son microorganismos de crecimiento lento.

Su estrategia y velocidad de crecimiento pueden ser características que permitan explicar su potencial actividad biológica.

REFERENCIAS

- Agogué, H., E. O. Casamayor, M. Bourrain, I. Obemosterer, F. Joux, G. J. Herndl, P. Lebaron. 2005. A survey on bacteria inhabitation the sea surface microlayer of coastal ecosystems, FEMS. Microbiology Ecology. Vol. 54:269-280.
- Baath, E. 1993. Measurement of protein synthesis by soil bacterial assemblages with the leucine incorporation technique. *Biology and Fertility of Soils*. 17: 147- 153.
- Baath, E. 1994. Thymidine and leucine incorporation in soil bacteria with different cell size. *Microbial Ecology*. 27: 267- 278.
- Baath, E. 1998. Growth rates of bacterial communities in soils at varying pH: a comparison of the thymidine and leucine incorporation techniques. *Microbial Ecology*. 36: 316- 327.
- Baltz, R. 2007. Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Current Opinion in Pharmacology*. 8: 557-563.
- Bredholt, H., Ol Galatenko, K. Engelhardt, E. Fjaervik, L. Terekhova y S. Zotchev. 2007. Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity. *Environmental Microbiology*. 9(11): 2756-2764.
- Bredholt, H., Fjaervik, E., Johnsen, G., Zotchev, S.B. 2008. Actinomycetes from Sediments in the Trondheim Fjord, Norway: Diversity and Biological Activity. *Marine Drugs*. 6(1): 12-24.
- Bull, A.T., J.E.M. Stach, A. C. Ward, M. Goodfellow. 2005. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie van Leeuwenhoek*. Vol. 87: 65-79.
- Canino-Herrera, S.R., Gaxiola-Castro, G., Segovia-Zavala, J.A.1990. Efecto de procesos físicos sobre la variación de clorofila, seston y productividad primaria en la ensenada norte de Bahía de los Ángeles. *Ciencias Marinas*. 17(2): 67-85.

- Cervantes-Duarte, R., J. L. Mueller, C. C. Trees, H. Maske, S. Álvarez- Borrego, R. Lara- Lara. 2000. Profundidad de la zona eufótica, atenuación de la irradiancia y K490 de sensores remotos en provincia bioópticas del Golfo de California. Ciencias Marinas. Vol. 26 (4): 533-560.
- Challis, G. L., Hopwood, D.A. 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. PNAS. 100(2): 14555- 14561.
- Charan, R. D., G. Schlingmann, J. Janso, V. Bernan, X. Feng y G. T. Carter. 2004. Diazepinomicin, a new antimicrobial alkaloid from a marine *Micromonospora* sp. Journal of Natural Products. Vol. 67(8):1431-1433.
- Church, M. J., D. Hutchins, H.W. Ducklow. 2000. Limitation of bacterial growth by dissolved organic matter and iron in the Southern Ocean. Applied and Environmental Microbiology. Vol.66(2): 455-466.
- Church, M.J., H.W. Ducklow, D.M. Karl. 2004. Light dependence of [H^3]Leucine incorporation in the oligotrophic North Pacific Ocean. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 70(7): 4079-4087.
- Davies, J. 2004. Streptomyces and beyond. Microbiology Australia. 25(2): 8-10.
- Davies, J. 2006. Are antibiotics naturally antibiotics. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 33: 496- 499.
- Dixon, J.L. y C. M. Turley. 2001. Measuring bacterial production in deep-sea sediments using 3H -thymidine incorporation: ecological significance. Microbial Ecology. 42: 549- 561.
- Eccleston, G., P. Brooks. y I. Kurtboke. 2008. The occurrence of bioactive Micromonosporae in aquatic habitats of the sunshine coast in Australia. Marine Drugs. 6: 243-261.

- Espinosa-Villegas, C.O. 1999. Distribución y estructura de las comunidades de foraminaferos bentónicos recientes de Bahía Concepción, B.C.S. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas. Ensenada, B.C. México. 61pp.
- Fabian, R. y A. Villalba. 1991. Sedimentología y geoquímica de la Bahía de los Ángeles Baja California, México. Boletín del Departamento de Geología de la Universidad de Sonora. 8(1): 29-40.
- Feling, R. H., G. O. Buchanan, T. J. Mincer, C. A. Kauffman, P. R. Jensen, W. Fenical. 2003. Salinosporamide A: A highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinispora*. Angewandte Chemie International Edition. Vol. 42(3):355-357.
- Fenical, W., P. R. Jensen. 2006. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. Nature Chemical Biology. Vol. 2(12): 666-673.
- Gontang, E.A, W. Fenical, P. Jensen. 2007. Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria cultured from marine sediments. Applied and Environmental Microbiology 37(10): 3272-3282.
- Groll, M., R. Huber y B. Potts. 2006. Crystal structures of Salinosporamide A (NPI-0052) and B (NPI-0047) in complex with the 20S proteasome reveal important consequences of beta-lactone ring opening and a mechanism for irreversible binding. Journal of American Chemistry Society. 128: 5136– 5141.
- Grossart H.P., A. Schlingoff, M. Bernhard, M. Simon, T. Brinkhoff. 2004. Antagonistic activity of bacteria isolated from organic aggregates of the German Wadden Sea. FEMS Microbiology Ecology. Vol. 47: 387-396.
- Hopwood, D. 2004. Genomes full of promise. Microbiology Australia. 25(2): 4-6.
- Invitrogen, 2008. Quanti-iT PicoGreen dsDNA reagent and kits: protocol manual. Molecular Probes-07581.

- Jensen, P.R., R. Dwight y W. Fenical. 1991. Distribution of Actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 57(4): 1102-1108.
- Jensen, P.R, E. Gontang, C. Mafnas, T. Mincer, W. Fenical. 2005. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environmental Microbiology*. 7 (7): 1039-1048.
- Jensen, P.R, T. Mincer, P. Williams. y W. Fenical. 2005_b. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie van Leeuwenhoek*. 87: 43-48.
- Jensen, P. R. y C. Mafnas. 2006. Biogeography of the marine actinomycete *Salinispora*. *Environmental Microbiology*. 8(11): 1881- 1888.
- Jensen, P.R, P. Williams, Dong-Chan Oh, L. Zeigler y W. Fenical. 2007. Species specific secondary metabolite production in marine actinomycetes of the genus *Salinispora*. *Applies and Environmental Microbiology*. 73(4): 1146- 1152.
- Jorgensen, N. 1992. Incorporation of ³H-leucine and ³H- valine into protein of freshwater bacteria: uptake kinetics and intracellular isotope dilution. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(11): 3638- 3646.
- Kirchman, D., E. K'nees, R. Hodson. 1985. Leucine incorporation ans its potential as a measure of protein synthesis by bacteria in natural aquatic systems. *Applied and Environmental microbiology*. 49(3): 599- 607.
- Magarvey, N. A., J. M. Keller, V. Bernan, M. Dworkin. 2004, Isolation and Characterization of Novel Marine-Derived Actinomycete Taxa Rich in Bioactive Metabolites, *Applied And Environmental Microbiology*. Vol. 70 (12): 7520–7529.
- Maier, R., I. Pepper, C. Gerba. 2000. *Environmental Microbiology*. Academic Press. United States of America. 585pp.

- Maldonado, L., J. Stach, W. Pathom-aree, A. Ward, A. Bull, M. Goodfellow. 2005. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie van Leeuwenhoek Journal*. Vol.87. 11-18.
- Maldonado, L., J. Stach, W. Pathom-aree, A. Ward, A. Bull y M. Goodfellow. 2005_b. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87: 11-18.
- Maldonado, L., W. Fenical, P.R. Jensen, C. Kauffman, T. Mincer, A. Ward, A. Bull y M. Goodfellow. 2005_c. *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae*. *Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55: 1759-1766.
- Maldonado, L., D. Fragoso-Yáñez, A. Pérez-García, J. Rosellón-Druker y E. Quintana. 2009. Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek*. 95: 111- 120.
- Marr. A. 1991. Growth rate of *Escherichia coli*. *Microbial Reviews*. 55(2): 316-333.
- Mincer, T. J., P. R. Jensen, C. A. Kauffman y W. Fenical. 2002. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 68(10): 5005-5011.
- Millán-Aguiñaga, N. 2009. Aislamiento, purificación y elucidación estructural de compuestos químicos extraídos de la esponja marina de Indonesia *Xestospongia* sp. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Marinas. Tesis de Maestría en Ecología Molecular y Biotecnología. 99pp.
- Moran, M., L. Rutherford 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): 3695-3700.

- Okazaki *et al.* 1976. En: Moran *et al.* 1995.
- Pace, M.L., G. McManus, S. Findlay. 1990. Planktonic community structure determines the fate of bacterial production in temperate lakes. *Limnology Oceanography*. 35: 795-808.
- Prieto-Davó, A. 2002. Inhibición del crecimiento de actinomicetos de sedimentos marinos por interacciones ecológicas entre ellos mismos. Tesis de Maestría en Oceanografía Costera. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, B.C., México. 53pp.
- Prieto-Davó, A., W. Fenical., P.R, Jensen. 2008. Comparative actinomycete diversity in marine sediments. *Aquatic Microbiology Ecology*. 52: 1-11.
- Rodríguez-Meza, G., E. Shumilin, D. Sapozhnikov, L. Méndez-Rodríguez y B. Acosta-Vargas. 2009. Evaluación geoquímica de elementos mayoritarios y oligoelementos en los sedimentos de Bahía Concepción (B.C.S., México). *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*. 61(1):57- 72.
- Rhodes, M. y P. Stanbury. 2001. *Applied microbial physiology: a practical approach. The practical approach series (PAS)*. 234pp.
- Rusnak, K., J. Troyanovich, R. Mierzwa, M. Chu, M. Patel, M. y M. Weistein. 2001. An antibiotic with activity against gram-positive bacteria from the gentamicin-producing strain of *Micromonospora purpurea*. *Applied Microbial Biotechnology*. 56: 502-503.
- Simon, M. y F. Azam. 1989. Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Marine Ecology Progress Series*. 51: 201-213.
- Singer, V.L., L.J. Jones, S.T. Yue, R.P, Haughland. 1997. Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation. *Analytical Biochemistry*. 249(2): 228-238.

- Smith, D. y F. Azam. 1992. A simple, economical method for measuring bacterial protein síntesis rates in seawater using ^3H -leucine. *Marine Microbial Food Webs*. 6(2): 107-114.
- Soria-Mercado, I. E. 2004. Aislamiento y elucidación estructural de seminaftoquinonas bioactivas, a partir de un nuevo género de actinomiceto marino de la familia Streptomycetaceae. Tesis de doctorado en Oceanografía Costera. Facultad de Ciencias Marinas. Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Universidad Autónoma de Baja California. 120 pp.
- Surajit- Das, P., S. Lyla, S. Ajmal-Khan. 2006. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. *Current Science*. Vol.98 (10): 1325-1335.
- Takizawa, M., R. Colwell y R. Hill. 1993. Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(4): 997-1002.
- Tibbles, B. 1996. Effects of temperatura on the incorporation of leucine and thymidine by bacterioplankton and bacterial isolates. *Aquatic Microbial Ecology*. 11: 239- 250.
- Udwary, D., L. Zeigler, R. Asolkar, V. Singan, A. Lapidus, W. Fenical, P.R. Jensen y B. Moore. 2007. Genome sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete *Salinispora tropica*. *PNAS*. 104(25): 10376- 10381.
- Varnam, A., M. Evans. 2000. *Environmental Microbiology*. ASM Press. Washington, D.C. USA. 160pp.