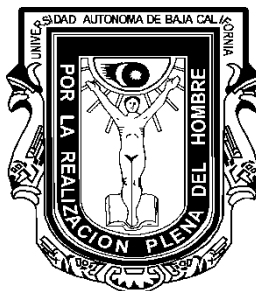


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS**



**ACTINOBACTERIAS AISLADAS DEL SEDIMENTO MARINO DEL
GOLFO DE CALIFORNIA Y DE BAHÍA TODOS SANTOS:
DIVERSIDAD, BIOACTIVIDAD Y DOMINIOS CETOSINTETASA**

T E S I S

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE**

DOCTORA EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFIA COSTERA

PRESENTA

AMAYALY BECERRIL ESPINOSA

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MEXICO. SEPTIEMBRE DEL 2011

RESUMEN

De la tesis que presenta Amayaly Becerril Espinosa como requisito parcial para la obtención del grado de Doctora en Ciencias en Oceanografía Costera.

ACTINOBACTERIAS AISLADAS DEL SEDIMENTO MARINO DEL GOLFO DE CALIFORNIA Y DE BAHÍA TODOS SANTOS:

DIVERSIDAD, BIOACTIVIDAD Y DOMINIOS CETOSINTETASA

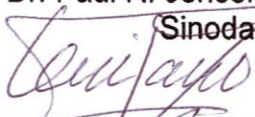
Aprobado por:



Dra. Irma E. Soria Mercado
Director de tesis



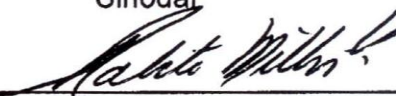
Dr. Paul R. Jensen
Sinodal



Dr. Leovigildo Quijano
Sinodal



Dr. Ramón Cajal Medrano
Sinodal



Dr. Roberto Millán Núñez
Sinodal

Como un esfuerzo para encontrar la cura de enfermedades mortales como el cáncer; diversas investigaciones se han enfocado a evaluar la producción de compuestos bioactivos en microorganismos aislados de hábitats no explorados como los océanos. Después de casi tres décadas de investigación en microbiología marina, ahora se sabe que las Actinobacterias marinas son una fuente prolífica de metabolitos secundarios con actividad antibacteriana, inmunosupresora y antitumoral. De las Actinobacterias marinas, se han descrito nuevos géneros que incluyen *Salinibacterium*, *Serinicoccus*, *Salinispora*,

Sciscionella y *Marinactinospora*; así como, diversas especies nuevas. Con el objetivo de caracterizar la diversidad de Actinobacterias cultivables del Golfo de California y de la Bahía de Todos Santos, México; en este trabajo se aislaron y preservaron 946 cepas de Actinobacterias; de las cuales se seleccionaron cepas de diferentes morfologías y se identificaron según el gen 16S ARNr. Las cepas identificadas se agruparon en unidades taxonómicas operacionales (UTOs) y de cada UTO se seleccionaron cepas para evaluar su potencial biotecnológico mediante ensayos de actividad antibiótica contra *Proteus vulgaris* y *Pseudomana aeruginosa* y actividad anticancerígena contra células de carcinoma colorrectal HCT-116, cervical HeLa y pulmonar H460; se encontraron cepas con actividad anticáncerígena y antibiótica de todos los géneros de Actinobacterias obtenidas en las diferentes localidades: desde 0 hasta 300 m de profundidad; los cuales pueden ser usados con fines biotecnológicos. Adicionalmente, cepas de *Salinispora arenicola* y “*S. pacifica* C y M” fueron sometidas a análisis de secuencias cetosintetasa, responsables del metabolismo biosintético de metabolitos secundarios.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que en el Golfo de California se encuentran nuevos taxos de Actinobacterias, resaltando la presencia Actinobacterias autóctonas marinas relacionadas a los géneros *Salinispora* ssp. y *Streptomyces* ssp.. Estos resultados sugieren que el Golfo de California posee características ambientales únicas que han permitido la selección de Actinobacterias distintas a las encontradas en ambientes de origen terrestres e incluso de origen marino; además con un patrón de secuencias

cetosintetasa distinto, que indican la capacidad metabólica para biosintetizar nuevos metabolitos secundarios con gran potencial biotecnológico.

ABSTRACT

In an effort to discover new compounds for the treatment of mortal illnesses like cancer; several studies has been focused to evaluate the production of bioactive compounds of isolated microorganisms from unexplored habitats such as the ocean. After almost three decades of research in marine microbiology, it is known that marine Actinobacteria are a prolific source of secondary metabolites with antibacterial, immunosuppressive and antitumor activity. New genera, including *Salinibacterium*, *Serinicoccus*, *Salinispora*, *Sciscionella* and *Marinactinospora* have been described among marine Actinobacteria, as well as several new species. With the objective of characterize the diversity of the viable Actinobacteria present in the Gulf of California and Todos Santos Bay, México; on the present Thesis work 946 Actinobacterial strains were isolated and cryopreserved; from which isolated strains of different morphology were selected and identified according to 16S rRNA gene. Identified strains were grouped in operational taxonomic units (OTUs) and strains from each OUT were selected to evaluate their biotechnological potential using antibiotic activity assays against *Proteus vulgaris* and *Pseudomana aeruginosa* and anticancer activity assays against colorectal cancer cells HCT-116, cervical cancer cells (HeLa) and lung cancer cells H460; there were found strains with antibiotic and anticancer activity from all Actinobacteria genus, obtained on the different localities from Om

to 300 m depth, which can be used for biotechnological purposes. In addition, strains of *Salinispora arenicola* y “*S. pacifica* C and M” were subjected for further analyses of ketosynthese domains within polyketide synthase genes which are responsible of biosynthetic routes of secondary metabolism.

The results of this work demonstrate that Gulf of California presents new Actinobacteria taxa, highlighting new marine autoctone Actinobacteria related to *Salinispora* sp. and *Streptomyces*. These results suggest that Gulf of California harbor unique environment characteristics that have lead to selection of Actinobacteria strains different of terrestrial or even other marine actinobacterias found to date; moreover with unique ketosynthase fingerprint, indicative of metabolic capability to synthesize new secondary metabolites with high biotechnological potential.

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFIA COSTERA

ACTINOBACTERIAS AISLADAS DEL SEDIMENTO MARINO DEL
GOLFO DE CALIFORNIA Y DE BAHÍA TODOS SANTOS:
DIVERSIDAD, BIOACTIVIDAD Y DOMINIOS CETOSINTETASA

T E S I S

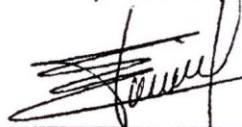
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

AMAYALY BECERRIL ESPINOSA

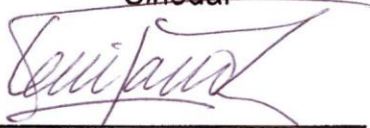
Aprobada por:



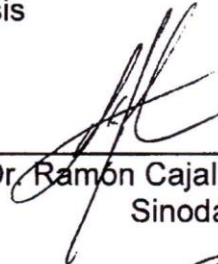
Dra. Irma E. Sorja Mercado
Director de tesis



Dr. Paul R. Jensen
Sinodal



Dr. Leovigildo Quijano
Sinodal



Dr. Ramón Cajal Medrano
Sinodal



Dr. Roberto Millán Núñez
Sinodal

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado con fondos de la XIII Convocatoria Interna de la UABC y UC-MEXUS 2007-2008-1 del proyecto “Actinomycetes from the Gulf of California as a novel resource for cancer drug discovery”.

Dedicatoria

A Dios

por darme la vida y permitirme compartirla con mi familia y amigos.

A mi abuelita Luz y Doña Silvia

con mucho cariño siempre las recordare.

A mi linda familia

quienes recorrieron este largo camino cerca de mí,

el amor y la unión de todos es el pilar de mi vida,

este éxito no es solo mío...es de todos ustedes.

Dedicatoria

- ❖ *A mi Bebesito tan chiquito gracias por hacerme tan feliz, nunca te detengas en la vida, no hay imposibles.*
- ❖ *A Héctor por ser mi amigo, esposo y amante; nadie lo vivió tan cerca.*
- ❖ *A mi máma Luz por su ejemplo de mujer y apoyarme en todo momento, aún cuando mis decisiones no siempre fueron las correctas.*
- ❖ *A mi Papá por darme siempre más de lo que tiene.*
- ❖ *A mis hermanos Erick y Salvador, por no rendirse, quienes con su inmenso cariño y apoyo incondicional siempre están conmigo aun en la distanciasiempre estaremos juntos apoyándonos.*
- ❖ *A mis grandes sobrinos Valeria y Leonardo por su cariño y amor, nunca se detengan en la vida luchan siempre por sus sueños.*
- ❖ *A Georgina y Gaby; a mis tíos, Conchita, Ricardo, José, Gloria; a mis primos, May, Fernando, Alejo, Vero, Lucha, Martha, Paty, Ricardo, Yeyo, Sara, Estela, Salvador; a mis sobrinos, Cesar, Celia, Orlando, José, Martin, Beto, Carlos, Quetsalli, Sarita, Arturo y Fernando por estar conmigo apoyándome y motivándome aun en la distancia.*
- ❖ *A los abuelitos Goya y Santos, a Don Héctor, Ulises, Omar, Isaac; a las familias Ocampo-Álvarez, Dorantes, Bello y Herrera... por los ánimos.*

AGRADECIMIENTOS

- ❖ Al sistema de becas de CONACyT y de México que me han permitido seguir estudiando.
- ❖ A la Dra Irma Soria por su dirección durante el desarrollo de este trabajo, por su confianza y su paciencia inagotable.
- ❖ A los miembros del jurado por sus valiosas observaciones y sugerencias al presente trabajo.
- ❖ Al Laboratorio Kaplan de Scripps y en especial al Dr Paul Jensen quien con sus asesorías se logró gran parte del desarrollo de este trabajo.
- ❖ Al Laboratorio Jorge de La Rosa de la UABC, por permitirme trabajar en su Laboratorio y en especial al Dr Luis por estar siempre allí para ayudarme y enseñarme algo de biología molecular.
- ❖ Al M en C. Héctor Ocampo por su apoyo en los muestreos, aislamiento, criopreservación de cepas, obtención de extractos y sugerencias al presente trabajo.
- ❖ Al laboratorio de Biología del Desarrollo del IIO y en especial al M en C. Leopoldo por su ayuda y facilitarme el uso del Agitador.
- ❖ Al Oceanologo Celso Barrila por su ayuda en la obtención de muchísimos extractos y en los bioensayos.
- ❖ A las Oceanologas, Dulce Guillen y Sugey Gomez por apoyarme amablemente en la criopreservación de algunas cepas.
- ❖ A Matt por la obtención de los espectro se Masas.

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A mis compañeros del grupo de investigación del Dr. Paul Jensen: Luzzy, Kelle Free, Anna Enmud, Matt, Deana, Nadinee, Sergio, Kevin y Leticia.
- ❖ A la FCM de la UABC y en especial a las secretarias.
- ❖ Mil gracias a todas aquellas personas que de una u otra forma han contribuido a mi formación profesional, especialmente a mis maestros.
- ❖ A los compañeros del Cubo: Raquel, Margarita, Santa, Miki, Polo, Erendira, Karlita y Manuel quienes me acompañaron en la última parte de la tesis.
- ❖ A mis amigos quienes me apoyaron en los momentos más difíciles vividos en este largo camino, a quienes me han escuchado, me han animado y me han divertido Eva Luz, Karlita, Lupita, Santa, Margarita, Anita, Laura, Ivone, Francisco, Felipe, María Luisa, Mari Carmen, Ricardo, Mildred, Karina y Celia.
- ❖ A Ivonne Best quien me escucho y tuvo una palabra de apoyo, de ánimo en los momentos que más lo necesite.
- ❖ A Karina de La Rosa, por ser mi amiga y acompañarme en alegrías, tristezas e histerias.
- ❖ A todos los amigos del norte y sur de México quienes sin su acompañamiento este camino se hubiera hecho eterno.
- ❖ A Ensenada, a sus paisajes impresionantes, a sus viñedos y a sus vinos.

INDICE

	Página
Índice.....	i
Lista de tablas	iv
Lista de figuras.....	v
1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
2.1. Generalidades de las Actinobacterias.....	4
2.2. Actinobacterias marinas.....	5
2.3. Generalidades del género <i>Salinispora</i>	6
2.4. Adaptación de las Actinobacterias marinas	8
2.5. Aislamiento de Actinobacterias marinas.....	9
2.6. Metabolitos secundarios aislados de Actinobacterias marinas...	10
2.7. Mecanismos de síntesis de las policétidos sintetasas (PKSs).....	15
2.8. Genes que codifican para la biosíntesis de metabolitos secundarios y su transferencia horizontal	18
3. Hipótesis	21
4. Objetivos	21
4.1. Objetivo general.	21
4.2. Objetivos particulares.....	21
5. Metodología	22
5.1. Colecta de Sedimento.....	23

Continuación Índice

5.1.1. Área de estudio.....	23
5.1.2. Trabajo de campo.....	28
5.2. Aislamiento de Actinobacterias	28
5.2.1. Morfología microscópica.....	30
5.2.2. Reacción Gram.	30
5.2.3. Formación del cepario de Actinobacterias.....	31
5.2.4. Preparación de extractos orgánicos a partir de Actinobacterias.....	31
5.3. Búsqueda de Actinobacterias bioactivas.....	32
5.3.1. Actividad citotóxica.....	32
5.3.2. Actividad antibiótica.....	32
5.4. Diversidad de Actinobacterias según el 16S ADNr.....	33
5.4.1. Purificación de ADN total.....	33
5.4.2. Determinación de la concentración de ADN total.....	33
5.4.3. Amplificación del gen 16S ADN ribosomal.....	33
5.4.4. Análisis filogenéticos.....	34
5.4.5. Unidades Taxonómicas Operacionales (UTOs).....	35
5.5. Genes biosintéticos del Metabolismo Secundario.....	35
5.5.1. Amplificación de las secuencias cetosintetasa (KS) por PCR y clonación.....	35

Continuación Índice

6. Resultados y discusión	37
6.1. Abundancia de Actinobacterias cultivables.....	38
6.1.1. Grupo I. Tipo micelio sustrato, no requieren de agua de mar para crecer	39
6.1.2. Grupo II. Tipo micelio sustrato que requieren de agua de mar para crecer.....	42
6.1.3. Grupo III. Tipo hifas aéreas	43
6.2. Recuperación de Actinobacterias en función del medio de cultivo.....	45
6.3. Diversidad de Actinobacterias cultivables.....	49
6.3.1. Unidades Taxonómicas Operacionales (UTOs).....	49
6.3.2. Diversidad de Actinobacterias que requieren agua de mar para crecer.....	55
6.4. Potencial biomédico de las Actinobacterias.....	59
6.4.1. Actividad antibiótica.....	59
6.4.2. Actividad anticáncer.....	63
6.4.3. Metabolitos secundarios bioactivos.....	65
6.5. Genes biosintéticos de metabolitos secundarios	71
7. Discusión general	81
8. Conclusiones	87
9. Referencias	89

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Número de Actinobacterias aisladas a partir de sedimento marino colectado en el Golfo de California y en la Bahía de Todos Santos	39
II	Identidad de secuencias más cercanas a las Actinobacterias aisladas	53
III	Abundancia, afinidad genética y UTOs de cepas de Actinobacterias	54
IV	Bioactividad de Actinobacterias	62
V	Porcentaje de similitud de las secuencias KS encontrados con rutas biosintéticas reportadas en el NCBI	79

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pagina
1 Árbol filogenético de las Actinobacterias marinas.....	6
2 Compuestos policétidos aislados de Actinobacterias marinas..	12
3 Estructura química de los policétidos marinomycinas	13
4 Mecanismo de biosíntesis de salinosporamida A	14
5 A) Mecanismo de elongación de la cadena policétida en un módulo PKS. B) Modificaciones de la cadena policétida producida por diferentes enzimas en un módulo de PKSs. C) Esquema general de la organización modular de la biosíntesis de las PKS.....	17
6 Diagrama de flujo de la metodología seguida.....	22
7 Localidades de muestreo.	23
8 Estaciones de colecta de sedimento en Bahía de Todos Santos y el Estero de Punta Banda Ensenada, Baja California (México).....	24
9 Estaciones de colecta de sedimento en San Felipe, Baja California (México).....	26
10 Estaciones de colecta de sedimento en la Bahía de Los Ángeles en el Golfo de California, Baja California (México).	26

Continuación Lista de Figuras

11	Estaciones de colecta de sedimento en la Bahía Concepción (Playa El Coyote, El Requesón, Santispac y Playa Armenta) en el Golfo de California, Baja California (México)	27
12	Estaciones de colecta de sedimento en Loreto, Baja California (México).....	27
13	Aislamiento de Actinobacterias.....	30
14	Porcentaje de Actinobacterias aisladas con relación a la localidad de sedimento.....	40
15	Abundancia de aislados por grupo de Actinobacterias	41
16	Imagen de colonias de Actinobacterias en diferentes medios de cultivo.....	46
17	Porcentaje de recuperación de Actinobacterias en función del medio de cultivo	47
18	Número de morfologías del grupo III encontradas respecto al medio de cultivo y el sitio de colecta de sedimento.....	48
19	Árbol filogenético de cepas de Actinobacterias representativas de los géneros <i>Nocardia</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Actinomadura</i> , <i>Verrucosispora</i> , <i>Nonomuraea</i> , <i>Nocardiopsis</i> y <i>Saccharomonospora</i>	51
20	Árbol filogenético de cepas representativas de Actinobacterias relacionadas con el género <i>Streptomyces</i>	52

Continuación Lista de Figuras

21	Árbol filogenético parcial del taxón nuevo de <i>Streptomyces</i> que requiere de agua de mar para crecer.....	57
22	Árbol filogenético de los filotipos de <i>Salinispora</i>	58
23	Porcentaje de actividad antibiótica de las Actinobacterias.....	61
24	Estructura de rifamicina P y su espectro de masas.....	67
25	Estructura química de monactin, y derivados de panamicin....	69
26	Espectro de masas del compuesto panamicin 607.....	69
27	Árbol filogenético de las secuencias cetosintetasa (KS) encontrados en cepas del género <i>Salinispora</i>	73
28	Secuencia de amino ácidos de las secuencias KS encontradas en cepas del género <i>Salinispora</i>	75
29	Mecanismo de ciclación del compuesto enediino	77

1. INTRODUCCION

La búsqueda de compuestos bioactivos ha cambiado a través del tiempo, al principio se trabajó con organismos terrestres, principalmente plantas, después, con el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928, se empezó a utilizar a los microorganismos como fuente para obtener fármacos. En particular, las Actinobacterias son ampliamente estudiadas por su habilidad para producir una gran variedad de compuestos bioactivos de importancia médica y alto valor comercial para la industria farmacéutica. El 70% de los metabolitos secundarios bioactivos reportados son producidos por estos microorganismos. El género *Streptomyces* es el más estudiado desde hace 60 años por producir alrededor 7,600 compuestos bioactivos, incluyendo fármacos antitumorales (Bérdy 2005). Sin embargo, en las últimas décadas el descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios provenientes de bacterias aisladas de los continentes empezó a disminuir y la investigación se orientó a buscar en hábitats no explorados, como lo es el medio marino (Mincer et al. 2002).

Después de casi tres décadas de investigación en el océano se han aislado Actinobacterias en el sedimento, en la columna de agua, en algas y animales marinos. El descubrimiento de Actinobacterias nuevas ha extendido su clasificación y aumentando la estimación de su abundancia. A la fecha, diferentes estudios taxonómicos de Actinobacterias marinas han permitido la descripción de géneros nuevos entre los que se encuentran *Salinibacterium*,

Serinicoccus, *Salinispora*, *Sciscionella* y *Marinactinospora* (Han et al. 2003, Yi et al. 2004, Maldonado et al. 2005, Tian et al 2009 a, b), y varias especies nuevas (Hozzein y Goodfellow 2007; Zhao et al. 2010). Los taxones de Actinobacterias nuevos tienen la capacidad de producir compuestos nuevos con actividad antitumoral y otras propiedades farmacológicas que no se habían observado en microorganismos terrestres (Olano et al. 2009). En el año 1991 se reportó la presencia de Actinobacterias que requieren agua de mar para crecer, el género llamado *Salinispora* con dos especies formalmente descritas *S. arenicola*, y *S. tropica* (Maldonado et al. 2005) y una tercera “*S. pacifica*” aún no descrita (Jensen 2010). Este género produce compuestos nuevos como salinosporamida A, el cual se encuentra en fase clínica para el tratamiento de cáncer (Fenical et al. 2009).

Las Actinobacterias marinas han activado la búsqueda de productos naturales marinos ya que día a día se encuentran nuevos compuestos bioactivos con posibilidades de ser aprovechados en la industria farmacéutica (Olano et al. 2009). Sin embargo, se sabe poco de su diversidad y de su papel ecológico en el océano.

Debido a la gran importancia de Actinobacterias y considerando que México cuenta con un territorio marino de más de 1 378 620 km² de las zonas costeras y oceánicas, 1.5 veces más que terrestre (Arriaga-Cabrera et al. 1998; De la Lanza 2004), es evidente la gran oportunidad de investigación que nuestros océanos y mares pueden ofrecer. Particularmente el Golfo de California,

también conocido como Mar de Cortés, es un sistema costero y marino con una área aproximada de 210, 000 Km². La zona costera peninsular carece casi totalmente de drenaje de ríos, debido a las condiciones de clima sub-desértico, mientras que la costa continental, se caracteriza por grandes suministros de agua dulce que alcanzan la línea de costa directamente a través de lagunas (Roden y Groves 1959). Se caracteriza por su alta productividad primaria (Álvarez-Borrego y Lara-Lara, 1991) y contiene diversos ecosistemas no alterados significativamente por actividad antropogénica como son Bahía de Los Ángeles y Bahía de Loreto que son áreas naturales protegidas categorizadas como reserva de la biosfera (Diario Oficial de la Federación 2002; 2007). Es un importante refugio natural de diversas especies marinas como son corales, plantas, reptiles, mamíferos, entre otros. Las características y hábitat del Golfo de California lo hace un lugar ideal para explorar la diversidad de Actinobacterias cultivables presentes en el sedimento marino. El objetivo del presente trabajo fue identificar grupos taxonómicos nuevos de Actinobacterias, empleando el gen 16S ARNr para determinar sus unidades taxonómicas operacionales (UTO's). Así mismo, se utilizaron cepas relacionadas al género *Salinispora* como modelo para buscar por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) las secuencias cetosintetasa (KS) y determinar el potencial biosintético de metabolitos secundarios que pueden ser producidos por estos microorganismos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de las Actinobacterias

Las Actinobacterias pertenecen al grupo Corineforme y al orden Actinomicetales, son Gram positivas cuya composición de bases de ADN es de 63 a 78 % guanina más citosina (G + C), encontrándose en el extremo superior de este límite con el porcentaje de G + C más alto que cualquier otra bacteria. La mayoría de estos organismos son aerobios (oxidativos), aunque algunos de ellos son anaerobios facultativos u obligados (fermentativos) (Logan 1994). Son microorganismos filamentosos, que crecen en forma de red llamado micelio; esta estructura puede permanecer en la superficie y se le denomina micelio aéreo, o bien, unida a la superficie del sustrato y se llama micelio sustrato. Los filamentos individuales o hifas del micelio se subdividen en unidades, producto de un crecimiento de la pared celular hacia el interior de la hifa en intervalos regulares a lo largo de esta estructura. A este proceso se le denomina septación y cada una de las septas resultantes contiene una molécula de ADN; su micelio aun siendo de dimensiones bacterianas es análogo al micelio que forman los hongos filamentosos (Nathan et al. 2004). Una característica particular de las Actinobacterias es que la reproducción lleva a la formación de esporas que son producidas en hifas especializadas, muchas de las cuales se desarrollan sobre el filamento aéreo. De manera general estas estructuras carecen de movilidad, aunque algunos géneros producen esporas flageladas.

Las Actinobacterias habitan en el suelo, pero se pueden encontrar en medios acuáticos. Estas bacterias son capaces de degradar muchas sustancias complejas como la quitina y consecuentemente juegan un papel muy importante en la química del suelo. De hecho, el olor característico del suelo es debido a metabolitos especiales denominados geominas que producen las Actinobacterias (Bull et al. 2000).

2.2. Actinobacterias Marinas

En el océano las Actinobacterias se encuentran en la columna de agua, en el sedimento y como simbioses en muchos organismos. La biodiversidad de Actinobacterias en la columna de agua es muy baja comparada con el resto de las bacterias de acuerdo a estudios realizados con el 16S ARN ribosomal usando unidades taxonómicas operacionales (UTOs) con un 97% de similitud, se observa un gradiente de la biodiversidad de Actinobacterias que aumenta de los polos hacia el ecuador (Pommier et al. 2007).

En particular, el sedimento marino contiene una macro y micro fauna muy diversa y las Actinobacterias se encuentran en mayor concentración que en la columna de agua. El descubrimiento de nuevas cepas ha extendido su clasificación y aumentando la estimación de su número (Stach, et al. 2003; Maldonado, et al. 2005). Con la ayuda de las técnicas moleculares se ha logrado clasificar a las Actinobacterias marinas ampliando el árbol filogenético de siete familias con al menos trece filotipos nuevos que han sido codificados como MAR 1 al 13 (Fig.1) (Fenical y Jensen 2006). Los grupos MAR son

estudiados actualmente por la producción de varios compuestos nuevos muy potentes como antibióticos y como inhibidores del crecimiento de células cancerígenas (Fenical y Jensen 2006).

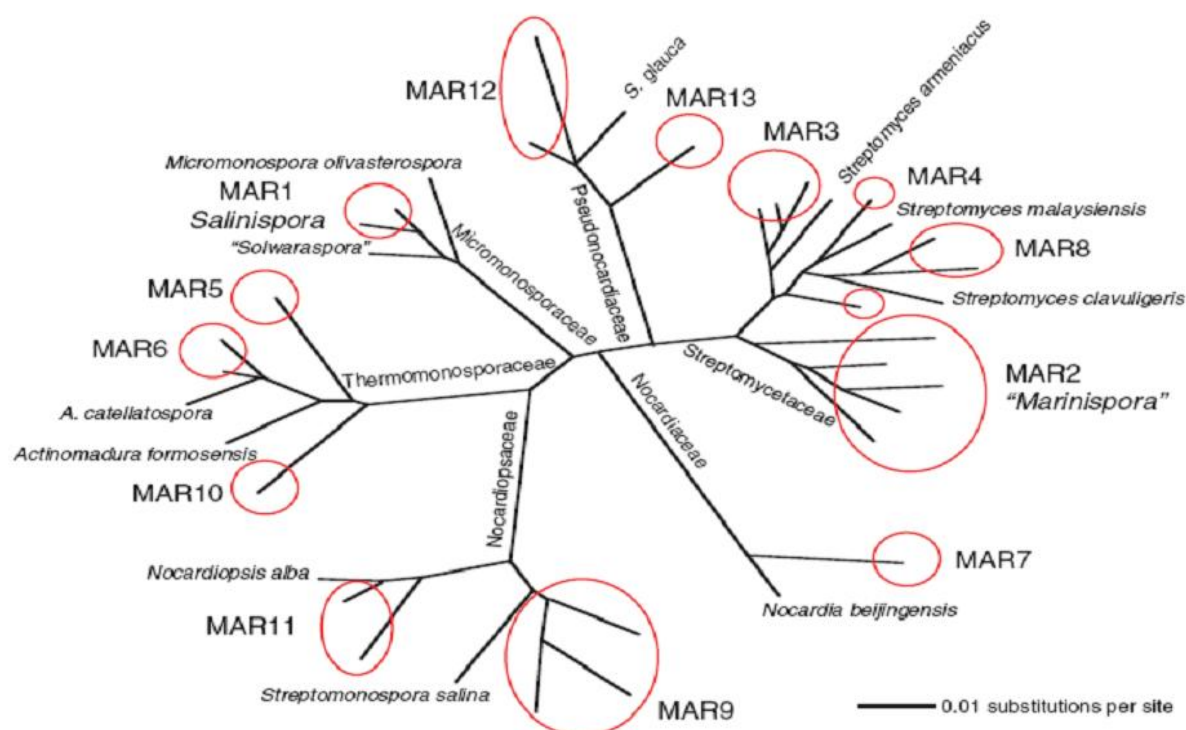


Figura 1. Árbol filogenético de Actinobacterias marinas (Fenical y Jensen 2006).

2.3. Generalidades del género *Salinispora*

En 1991 se reportó el aislamiento y distribución de actinomicetos presentes en el sedimento marino de Bahamas, relacionados a la familia *Micromonosporaceae* con la característica de requerir agua de mar para crecer (Jensen et al 1991). Posteriormente en el año 2002 este grupo taxonómico nuevo fue codificado como MAR 1 y llamado "*Salinispora*" (Mincer et al. 2002), la descripción formal

de dos especies: *Salinispora arenicola* y *Salinispora tropica* dio el cambio del nombre de “*Salinospora*” por *Salinispora* (Maldonado et al. 2005), se ha propuesto una tercera especie “*S. pacifica*” aún no descrita. A partir del año 1991, se han aislado miles de cepas de *Salinispora* en diferentes localidades de los océanos Pacífico y Atlántico, marcando una distribución biogeográfica en sedimentos pantropicales (Jensen y Mafnas 2006). Las tres especies de *Salinispora* están estrechamente relacionadas con un 99% de similitud de secuencia en el gen 16S ARNr en donde solo difieren 5 nucleótidos. Hasta la fecha, no se ha encontrado diversidad intraespecífica en *S. tropica* y únicamente se ha aislado en el sedimento de Bahamas. En cambio un solo filotipo de *S. arenicola* se ha aislado de varias localidades como el Mar Rojo, Islas Guam, Palau, Virginias, Bahamas y Fiji; así mismo, en el Golfo de California se han encontrado dos filotipos diferentes de *S. arenicola* y entre ellos varían tan solo en 1 y 2 nucleótidos en el gen 16S ARNr, lo que sugiere un aislamiento geográfico. “*S. pacifica*” se ha aislado en el Atlántico, República de Palau, Guam, Hawái y Fiji y solo se han encontrado tres filotipos. El género *Salinispora* es productor de varios compuestos con actividad antibiótica y anticancerígena contra varias líneas celulares (Jensen 2010).

2.4. Adaptación de las Actinobacterias marinas

El conocimiento sobre bacterias marinas Gram positivas y en especial de las Actinobacterias es significativamente deficiente. Dentro de los factores fisicoquímicos que intervienen en la adaptación de las bacterias que habitan el sedimento marino son la salinidad y la presión.

Estas bacterias son capaces de resistir una enorme presión hidrostática. Si consideramos que la presión aumenta 1 atmósfera (atm) cada 10 m de profundidad, los microorganismos aislados a 2000 m de profundidad, deben soportar 200 atm de presión, por lo que se les considera barotolerantes. La presión afecta a la fisiología y a la bioquímica de la célula y se ha demostrado que el aumento de la presión disminuye la capacidad de fijación de las enzimas a sus sustratos. Por lo tanto las enzimas deben estar plegadas de manera que el efecto causado por las altas presiones sea mínimo (Madigan 2006; Horikoshi 1998).

La salinidad y en especial el sodio (Na^+) juega un papel fisiológico muy importante en las bacterias marinas, se propone que se genera un gradiente de Na^+ transmembranal con un potencial de energía, que puede ser utilizado para varias funciones celulares incluyendo la generación de ATP, el transporte de muchos solutos, la respiración, la regulación del pH y la movilidad flagelar (Dimroth 1987; Nakamura et al. 1992; Kogure 1998; Häse et al. 2001; McCarter 2001). Además de sodio, requieren otros iones que mantienen la integridad celular como son el potasio, el magnesio y el calcio, que son usados en su

crecimiento y en la estabilidad osmótica (Johnson y Harvey 1938; MacLeod y Matula 1961, 1962; MacLeod 1965; Unemoto et al. 1973). El género *Salinispora* considerado como el primer microorganismo halófilo y autóctono del mar, no crece en agua de libre de iones y su crecimiento máximo en medio de cultivo con iones monovalentes como sodio es a 5.0 mM y/o potasio es a 4.3 mM. Las especies *S. arenicola* y *S. tropica* en medios de cultivo presentan un crecimiento máximo en presencia de altas concentraciones de magnesio y bajas concentraciones de calcio o viceversa. Sin embargo, en “*S. pacifica*” el requerimiento de magnesio y calcio es más estricto pues el máximo crecimiento es en presencia de ambos cationes con altas concentraciones de magnesio (17.5mM) y calcio (3.0 mM) (Ginger y Kin 2010).

2.5. Aislamiento de Actinobacterias marinas

Debido a la importancia médica e industrial de los compuestos producidos por Actinobacterias marinas, se ha trabajado intensamente en el aislamiento de cepas nuevas de las bacterias marinas, sin embargo no se ha encontrado un medio de cultivo en el que se aíslen todas las Actinobacterias existentes y se presume que solamente el 1% es cultivable. La optimización de los medios de cultivo va desde aquellos que solamente contienen agua de mar hasta los formulados con vitaminas, almidón, peptona, empleando fungicidas como la ciclohexamida y/o antibióticos como nistatina y rifampicina. (Gontang et al. 2007; Kaeberlein et al. 2002; Takefumi et al. 2005; Masayuki et al.1987; Masayuki et al. 1993; Satyabatan et al. 1964).

2.6. Metabolitos secundarios aislados de Actinobacterias marinas

Los metabolitos secundarios son definidos como compuestos no esenciales para el crecimiento y reproducción del organismo que los produce. Su producción en las Actinobacterias se cree que está ligada al proceso de esporulación y ocurre en condiciones limitadas de nutrientes. Esta ventaja permitiría llevar a cabo el proceso de esporulación y por lo tanto de aumentar las posibilidades de supervivencia (Agongué et al. 2005).

Desde la década de los sesentas se ha incrementado el descubrimiento de compuestos nuevos a partir de organismos marinos, destacando las Actinobacterias marinas como la principal fuente de los metabolitos secundarios bioactivos (John et al. 2007).

La mayoría de los metabolitos secundarios que se han aislado de Actinobacterias marinas son del tipo policétidos. Las enzimas claves en la biosíntesis de estos compuestos se conocen como policétido sintetetasas (PKSs), la síntesis de la cadena policetónica es por medio de condensaciones sucesivas de unidades de ácidos carboxílicos como residuos de acetato, propionato y butirato u otros residuos acilos más complejos. En cada condensación se unen dos átomos de carbono y se origina un grupo carbonilo, después de varias condensaciones se forma la cadena policetónica, finalmente sufre ciclaciones para dar la estructura y estereoquímica final del compuesto.

Los policétidos obtenidos de Actinobacterias marinas presentan actividades farmacológicas muy importantes, destacando los policétidos con actividad antitumoral, como los compuestos arenicolidas A y B producidos por *S. arenicola* cepa CNR-005 aislada de sedimento marino colectado a 20 m de profundidad alrededor de la Isla de Guam (Fig. 2), son macrolactonas poli-insaturadas de 26 miembros con citotoxicidad contra la línea celular de adenocarcinoma de colon humano HCT-116 con una concentración inhibitoria media (IC₅₀) de 30 µg/mL, además, se propone su uso como agente quimiopreventivo de cáncer pues inhiben la ornitina descarboxilasa (OD), la cual actúa directamente en la transcripción del oncogén *myc* inhibiendo así la sobre expresión de varios tumores celulares (Williams et al. 2007a,b; Gerner et al. 2004).

Los compuestos marmycinas A y B pertenecen a la clase angucyclina y fueron obtenidos del cultivo de *Streptomyces* sp. cepa CNH990 aislada de sedimento marino colectado a 20 m de profundidad en el Mar de Cortés, a 5 km al este de Cabo San Lucas, México. En los ensayos de citotoxicidad se usaron células de cáncer de colon HCT-116 y marmycina A mostró un IC₅₀ de 60.5 nM, casi 18 veces más potente que marmycina B, el cual mostró un IC₅₀ de 1.09 µM. Otros reportes de citotoxicidad de marmycina A han mostrado valores de IC₅₀ de 0.022 µM contra 12 diferentes líneas celulares de cáncer (mama, próstata, colon, pulmón y leucemia), en el mismo ensayo, marmycina B fue menos potente con un IC₅₀ de 3.5 µM (Fig. 2) (Martin et al. 2007).

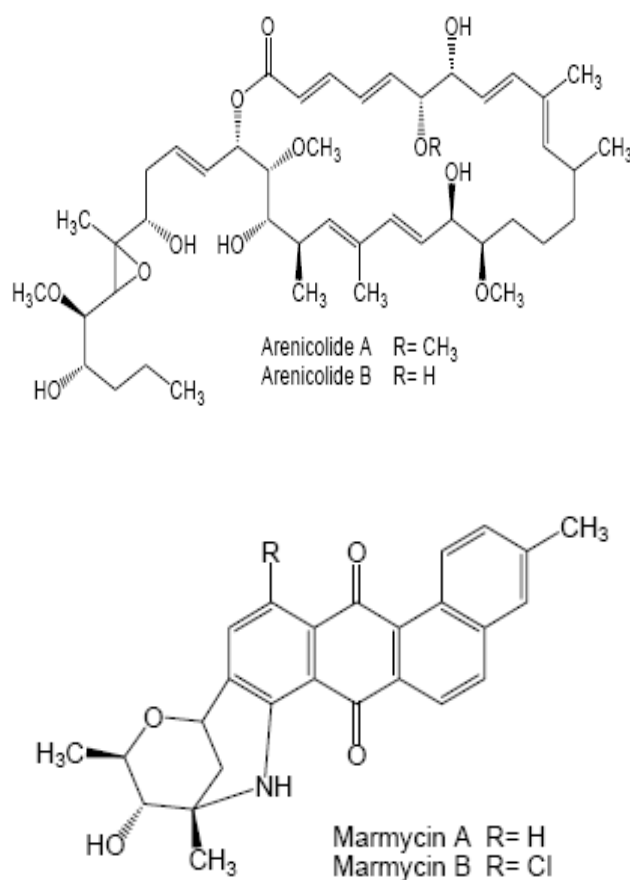


Figura 2. Compuestos policétidos aislados de Actinobacterias marinas (Tomada y modificada de Williams et al 2007, Martin et al. 2007).

Una nueva clase de policétidos llamados marinomycinas (Fig. 3), con una estructura inusual de macrodiolidos formados por dímeros de lactonas ácidas de 2-hidroxi-6-alquenil benzoico conjugados con cadenas de tetraeno-pentahidroxipolicétido (Fig. 3), son producidos por “*Marinispora* sp”. cepa CNQ-140 aislada del sedimento marino colectado a 56 m de profundidad fuera de costa de La Jolla, California. Estos compuestos inhiben la proliferación selectiva de varias líneas celulares de cáncer con una concentración letal media (LC₅₀) de 0.2-2.7 μ M. Marinomycina A es muy selectivo al atacar a células del

melanoma humano LOX IMVI, M14, SK-MEL-2, SK-MEL-5, UACC-257 y UACC-62, siendo más potente con el melanoma SK-MEL-5 con un LC_{50} de 5.0 nM. Marinomycinas B y C mostraron actividades contra melanoma SK-MEL-5 con una LC_{50} de 0.9 y 0.2 μ M respectivamente. La potencia y especificidad de estos compuestos contra algunas líneas celulares de cáncer sugiere que son muy selectivos, sin embargo, aún no se conoce el mecanismo de acción (Kwon et al. 2006).

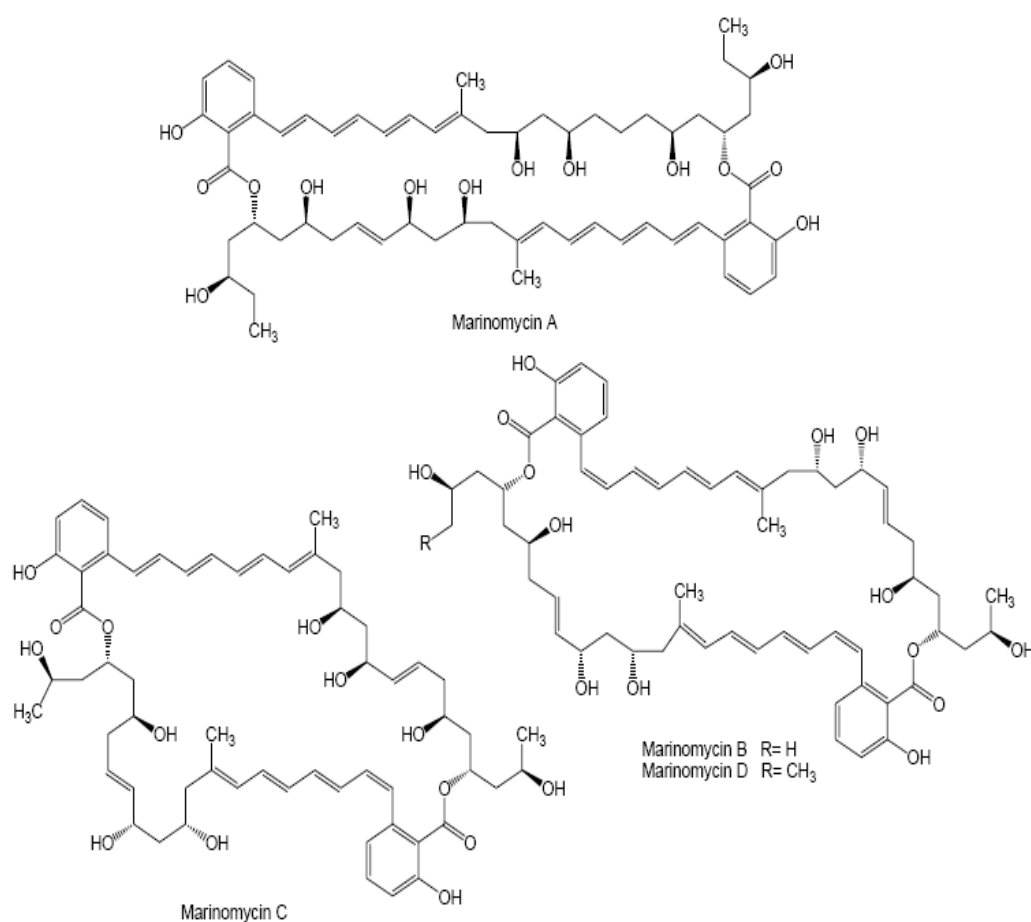


Figura 3. Estructura química de los policétidos marinomycinas (Tomada de Kwon et al. 2006).

Uno de los productos naturales marinos más prometedor para uso en el tratamiento de cáncer es el compuesto salinosporamida-A, el cual es una β -lactona- γ -lactama que contiene un átomo de cloro, con actividad inhibitoria del proteosoma 20S que induce la apoptosis de las células múltiples de mieloma actuando en diferentes líneas celulares con una LC_{50} muy baja, por ejemplo en células de carcinoma colorectal HCT-116 tiene una LC_{50} de $0.035 \mu\text{M}$, en células de melanoma, cáncer de pulmón, de ovario y de próstata, la LC_{50} es $< 0.011 \mu\text{M}$ (Feling, et al. 2003). El mecanismo de síntesis de este compuesto involucra genes PKS y péptidos nonribosomal sintetasa (NRPSs). El módulo PKS presenta una condensación con acetil-CoA y cloroetilmalonyl-CoA produciendo un intermediario tipo β -tioester, finalmente se ensambla el gen amino non-proteína (Fig. 4) (Eustáquio et al. 2009).

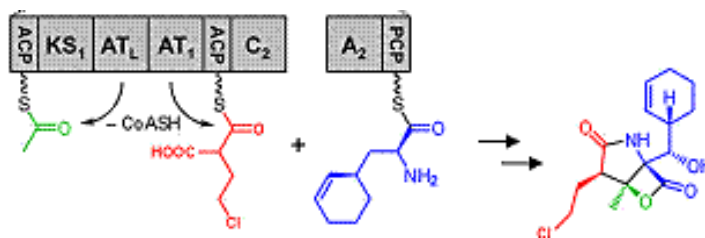


Figura 4. Mecanismo de biosíntesis de salinosporamida A (Tomada de Eustáquio et al 2009).

2.7. Mecanismo de síntesis de las policétidos sintetasas (PKSs).

Los policétidos tienen en común una ruta biosintética que involucra un complejo multienzimático denominado policétido sintetasas (PKS, por sus siglas en inglés), el cual es similar al empleado en la síntesis de ácidos grasos tipo I (FAS) de hongos y animales. Los PKS requieren miles de nucleótidos con unidades secuenciales repetidas en el gen que dan lugar a una organización conocida como modular y cada módulo esta catalizado por varios dominios.

El mecanismo de síntesis de las PKSs contiene una unidad iniciadora, una unidad de elongación que genera la cadena policetónica lineal y una unidad de terminación. En los PKSs se encuentran tres dominios indispensables: acetiltransferasa (AT), cetosintetasa (KS) y proteína transportadora de grupos acilo (ACP); y por otros dominios catalíticos no indispensables como cetorreductasa (KR), deshidratasa (DH) y enoilreductasa (ER) y el dominio tiolesterasa (TE) que se encarga de finalizar la biosíntesis de la cadena policetónica (Fig. 4) (Slezen 2008; Hopwood 1997).

En la biosíntesis de PKSs la unidad iniciadora puede ser acetil-coenzima A (CoA) o propionil-CoA; la molécula de acetato es trasferida inicialmente por la acción de una AT al grupo tiol del brazo del dominio ACP para su condensación.

Posteriormente hay una elongación de la cadena por sucesivas incorporaciones de unidades de malonil-CoA o para policétidos complejos se pueden adicionar metilmalonil-CoA o etilmalonil-CoA, formando cadenas laterales de metilo o etilo

en la estructura del policétido; en cada módulo de elongación el grupo carbonilo incorporado puede sufrir modificaciones por las diferentes enzimas, por ejemplo, la presencia de KR dará lugar a un hidroxilo, posteriormente con DH se formará un grupo enoilo y se puede obtener un enlace C-C totalmente reducido en presencia de ER. Pueden existir tantos módulos en la elongación como requiera el esqueleto de carbono de la molécula. Finalmente en la terminación la TE elimina el grupo tiol para dar fin la síntesis de la cadena policétida. Una vez sintetizada esta cadena sufrirá una serie de modificaciones involucrando procesos de plegamiento y ciclación que dan lugar a policétidos aromáticos o macrólidos (Fig. 5) (Slezen, 2008; Cane 1998).

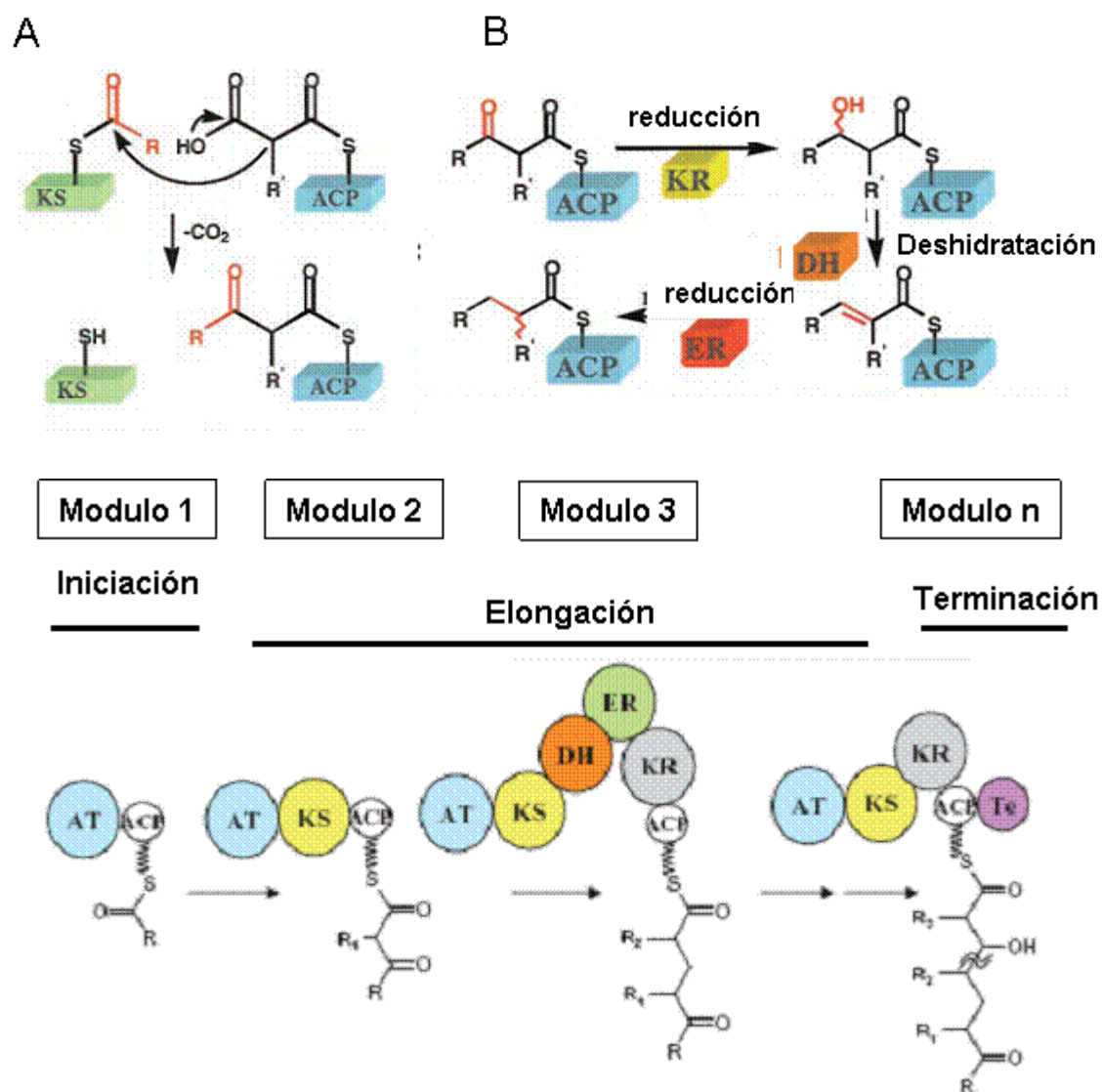


Figura 5 A) Mecanismo de elongación de la cadena policétida en un módulo PKS. B) Modificaciones de la cadena policétida producida por diferentes enzimas en un módulo de PKSs. C) Esquema general de la organización modular de la biosíntesis de las PKS. Acetiltransferasa (AT), cetosintetasa (KS), proteína transportadora de grupos acilo (ACP), cetorreductasa (KR), deshidratasa (DH), enoilreductasa (ER), cetoreductasa (KR) y tiolesterasa (TE). Figuras tomadas y modificados de Slezen (2008) y Cane (1998).

2.8 Genes que codifican para la biosíntesis de metabolitos secundarios y su transferencia horizontal

Los genes que participan en la biosíntesis de los metabolitos secundarios están ordenados en regiones continuas definidas dentro del genoma, lo que permite la detección de rutas biosintéticas completas. Estos genes pueden transmitirse de una generación a otra cuando un microorganismo recibe material genético de sus ancestros, por medio de la transferencia de genes vertical (TGV). Sin embargo, en la comunidad microbiana existe un intercambio de genes entre todas las células, permitiendo un intercambio de material genético de un organismo a otro que no es su descendiente por medio de una transferencia de genes horizontal (TGH). Existen tres mecanismos de TGH:

Transformación: en donde una bacteria incorpora un plásmido libre a su material genético.

Transducción: en donde un virus no virulento inyecta el material genético a la bacteria y esta lo incorpora a su ADN.

Conjugación bacteriana: en donde una célula por medio de un pili inyecta un plásmido a otra bacteria.

Los tipos de genes susceptibles a transferencia de genes horizontal están asociados a funciones no esenciales o rasgos adaptativos. Incluyendo genes

auxiliares como los involucrados en la biosíntesis de metabolitos secundarios (Ginolhac et al. 2005).

La TGH es muy común en Actinobacterias; tal es el caso de las Actinobacterias *Actinomadura kijaniata* aislada del suelo y la cepa marina CNR-885 relacionada a la especie *Streptomyces tandae*, las cuales tienen la capacidad de biosintetizar el macrólido policétido kijanimmicin 53; sus secuencias de KS están asociadas a la ruta biosintética de este macrólido con porcentaje de similitud del 81-91%. Esto provee evidencia de que estas cepas de hábitat distintos y de diferentes familias presentaron una transferencia de genes horizontal (Gontang et al. 2010).

Otro ejemplo se tiene con las cepas CNJ-927 (*Serinicoccus marinus*) y CNR-923 (*Nocardiopsis lucentensis*), ambas aisladas del sedimento marino de Islas Palau, las cuales están relacionadas a diferentes familias del orden *Actinomycetales* y poseen secuencias de KS muy similares (99.11% de similitud de secuencia), sugiriendo que ellas han presentado una transferencia de genes horizontal reciente. Sin embargo, la ruta metabólica asociada a estas dos secuencias KS tienen un porcentaje de similitud muy bajo (53%) a la ruta metabólica asociada al compuesto clorotricina, indicando que ambas cepas tienen la capacidad de biosintetizar el mismo metabolito secundario nuevo (Gontang et al. 2010).

Si no existiera TGH, cepas de la misma especie producirían el mismo tipo de compuestos (“quimiotipo”), debido a la TGH es posible encontrar cepas aun dentro de la misma especie o subespecie capaces de producir metabolitos

secundarios diferentes. Por ejemplo en cinco cepas de “*S. pacifica*” filotipo estándar, aisladas de sedimentos colectados en Islas Guam, Palau, y del Mar Rojo se encontró que producen el quimiotipo cianosporasida A, sin embargo, en “*S. pacifica* filotipo B” (cepa CNS-055) aislada de sedimento colectado en Islas Palau no se encontró cianosporasida A, pero se detectó la síntesis de salinispirona A. Según el 16S del ARNr las cinco cepas de “*S. pacifica*” secuencia estándar no tienen diferencias entre ellas, pero presentan tres nucleótidos de diferencia con la cepa CNS-055 filotipo “B”. Sugiriendo que diferentes filotipos de la misma especie contienen distintos policétidos sintetizados (Gontang et al. 2010).

Se ha encontrado que aun dentro de una misma especie de Actinobacteria se producen metabolitos secundarios diferentes, por ejemplo en cepas de *S. arenicola* que no tienen diferencias filogenéticas según el 16S ARNr con otras 30 cepas de la misma especie producen ciclomarín-A compuesto previamente aislado de un *Streptomyces* (marino), este compuesto es un ciclopéptido con actividad antiviral y antiinflamatoria, por lo que se concluye que el gen que codifica para la biosíntesis de este metabolito secundario se adquirió recientemente, eventualmente por selección débil para la biosíntesis o se adquirió regionalmente (Gontang et al. 2010).

3. HIPOTESIS

Tanto el Golfo de California como la Bahía de Todos los Santos son fuentes potenciales de nuevas unidades taxonómicas operacionales de Actinobacterias cultivables, productoras de metabolitos secundarios con potencial biomédico.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar la diversidad de Actinobacterias cultivables marinas biotecnológicamente relevantes presentes en el Golfo de California y en la Bahía de Todos Santos.

4.2. Objetivos particulares

- 1.- Aislar Actinobacterias marinas del sedimento marino de la Bahía de Todos Santos y del Golfo de California para formar un cepario.
- 2.- Determinar la diversidad de Actinobacterias cultivables presente en diferentes localidades del sedimento del Golfo de California y de la Bahía de Todos Santos.
- 3.- Determinar la abundancia, distribución y diversidad de Actinobacterias cultivables y estrictamente marinas.
- 4.- Explorar el potencial biomédico de las Actinobacterias.
- 5.- Evaluar la capacidad biosintética de metabolitos secundarios empleando secuencias cetosintetasa (KS).

5. METODOLOGIA

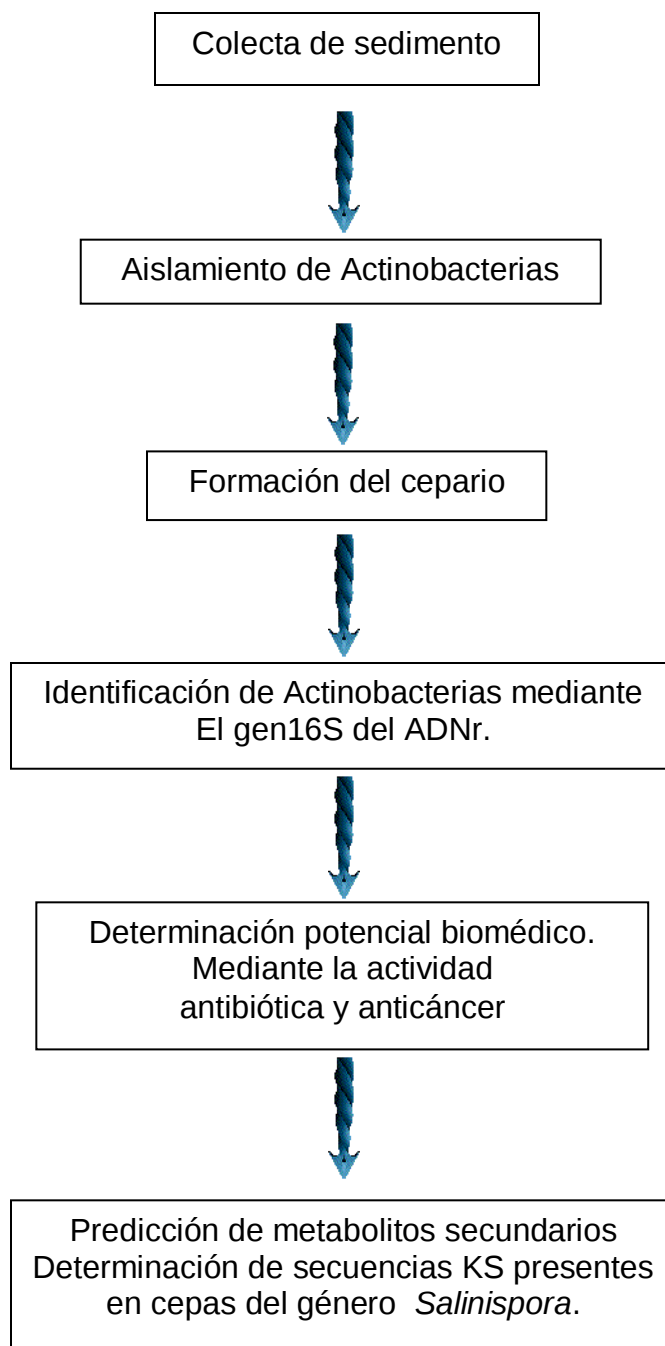


Figura 6. Diagrama de flujo de la metodología seguida.

5.1. Colecta de Sedimento

5.1.1. Área de estudio

Se realizaron tres expediciones para la colecta de sedimento, la primera se realizó en la Bahía de Todos Santos en abril del 2007, la segunda en San Felipe en noviembre del 2007 y la última recorriendo diferentes puntos del Golfo de California en abril del 2008, con permiso de la Secretaría de Pesca (Permiso de Pesca de Fomento No. DGOPA.06472.110909.3745). En la figura 7 se muestran las localidades de muestreo.

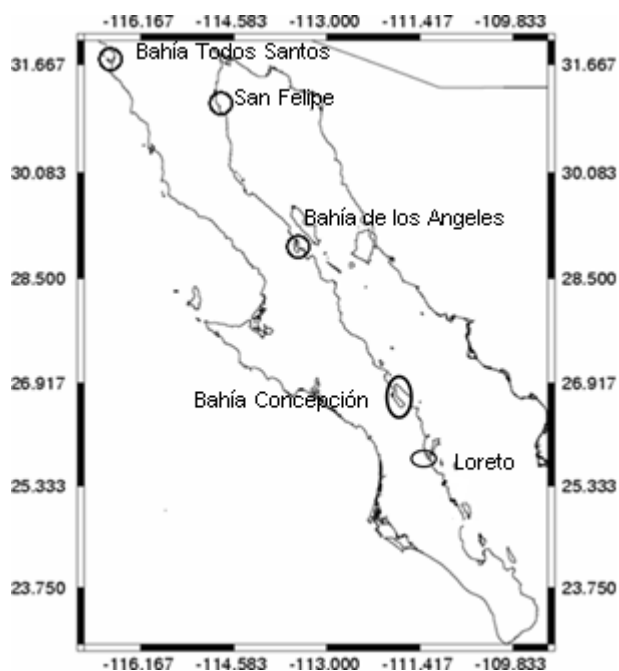


Figura 7. Localidades de muestreo.

La Bahía de Todos Santos se localiza en el extremo Noroeste de la península de Baja California (México) se encuentra limitada al norte por Punta San Miguel, al sur por Punta Banda, al este por la playa que va desde la rada portuaria hasta la boca del Estero de Punta Banda y al oeste por las islas de Todos Santos (Fig. 8).

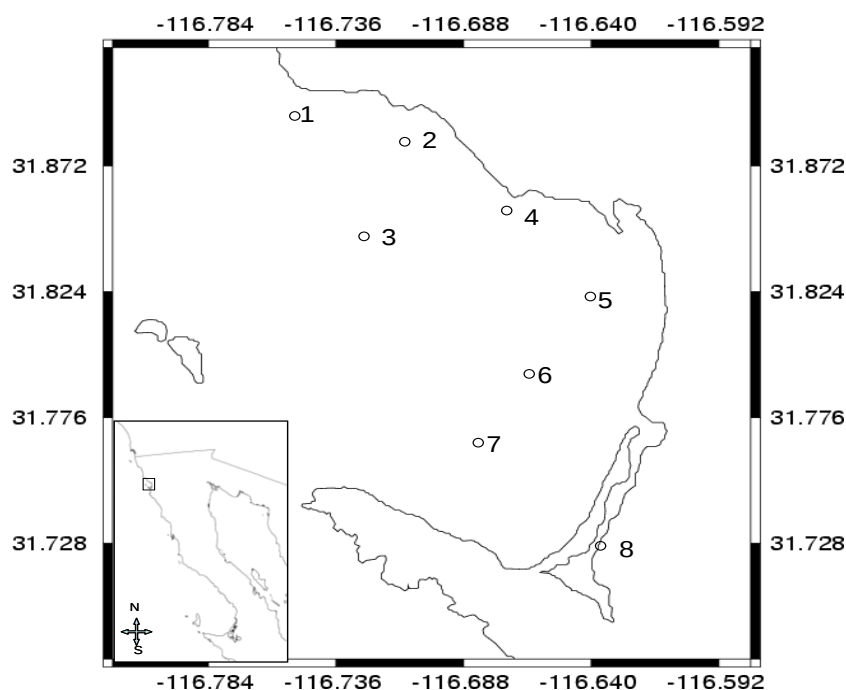


Figura 8. Estaciones de colecta de sedimento en Bahía de Todos Santos y el Estero de Punta Banda Ensenada, Baja California (México).

El Golfo de California, también conocido como Mar de Cortés, es un cuerpo de agua que separa la península de Baja California del continente (22-32 ° N y 105-107 ° W). Tiene una longitud de 1100 km y una anchura entre 80-209 km (Argote et al. 1995), con un área aproximada de 210, 000 Km². En la región norte hacia fuera de la costa la profundidad promedio es aproximadamente 200 m, y una gran cantidad de sedimentos son mantenidos en suspensión por las

fuertes corrientes resultado del extremo rango de mareas (ej., más de 6.95 m en San Felipe) (Roden y Grovese 1959). La zona costera Peninsular, está formada mayormente por roca, pero con zonas arenosas dispersas; además carece casi totalmente de drenaje de ríos, debido a las condiciones de clima sub-desértico. La costa continental, se caracteriza por grandes playas de arena, lagunas costeras y bahías abiertas; grandes suministros de agua dulce que alcanzan la línea de costa directamente o a través de lagunas. El Golfo de California es una región de alta productividad primaria (Álvarez-Borrego y Lara-Lara 1991), y alberga un conjunto único de hábitats desde bosques de manglar tropical, hasta arrecifes de coral en la parte sur, incluyendo una amplia variedad de hábitats intermareales encontrados a lo largo de todo el golfo (Lluch-Cota et al. 2007). En las figuras 9, 10, 11 y 12 se muestran las estaciones de colecta realizadas en San Felipe, Bahía de los Ángeles, Bahía Concepción y Loreto, Baja California, México respectivamente.

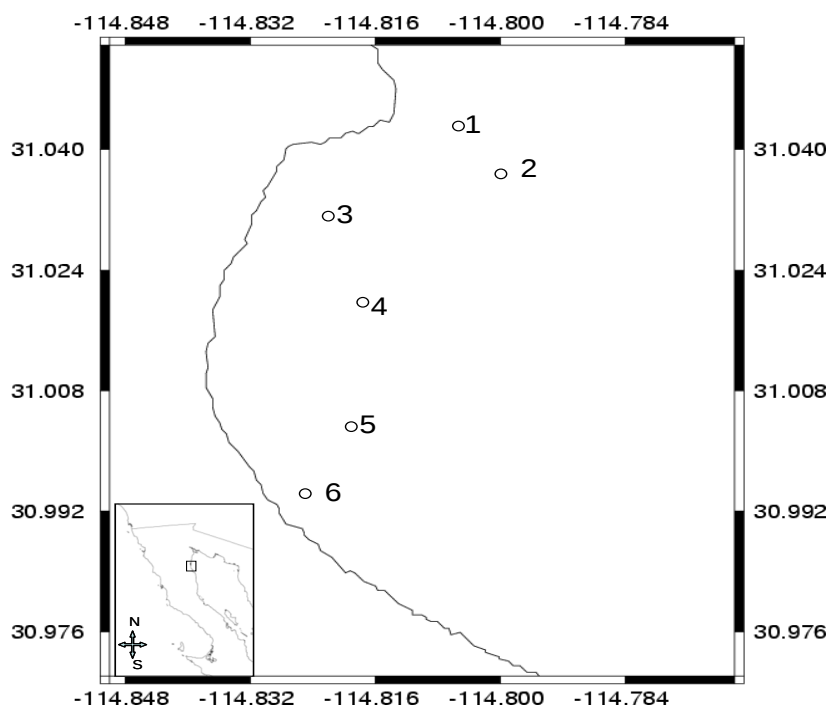


Figura 9. Estaciones de colecta de sedimento en San Felipe, Baja California (México).

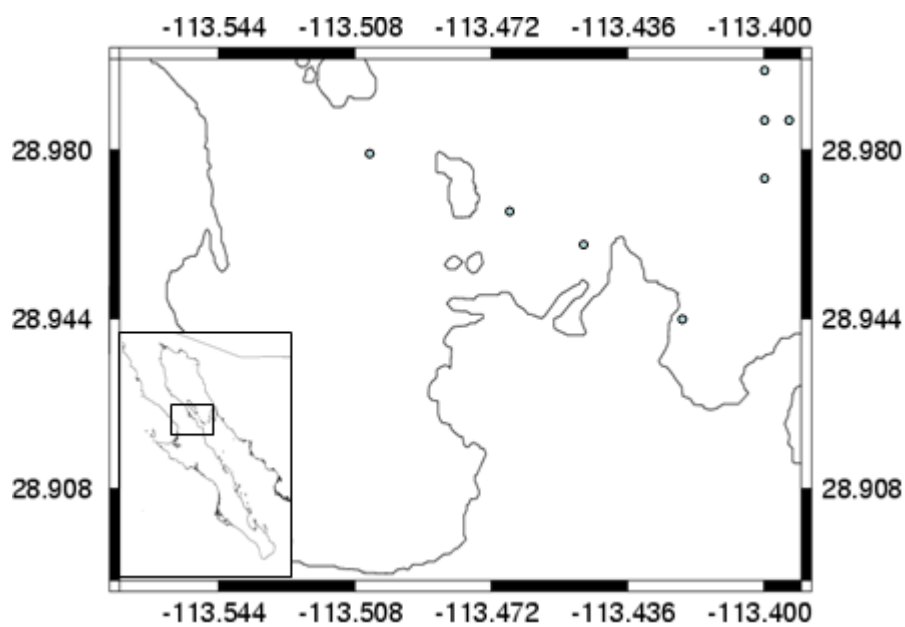


Figura 10. Estaciones de colecta de sedimento en la Bahía de Los Ángeles en el Golfo de California, Baja California (México).

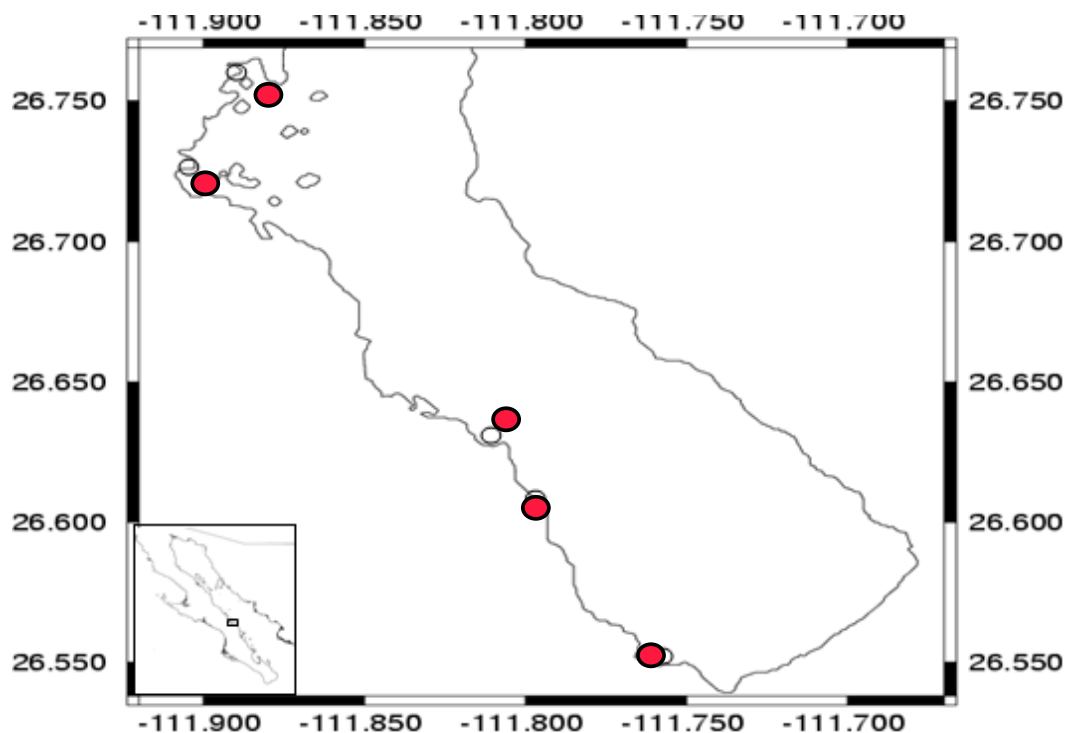


Figura 11. Estaciones de colecta de sedimento en la Bahía Concepción (Playa El Coyote, El Requesón, Santispac, Playa Armenta) en el Golfo de California, Baja California (México).

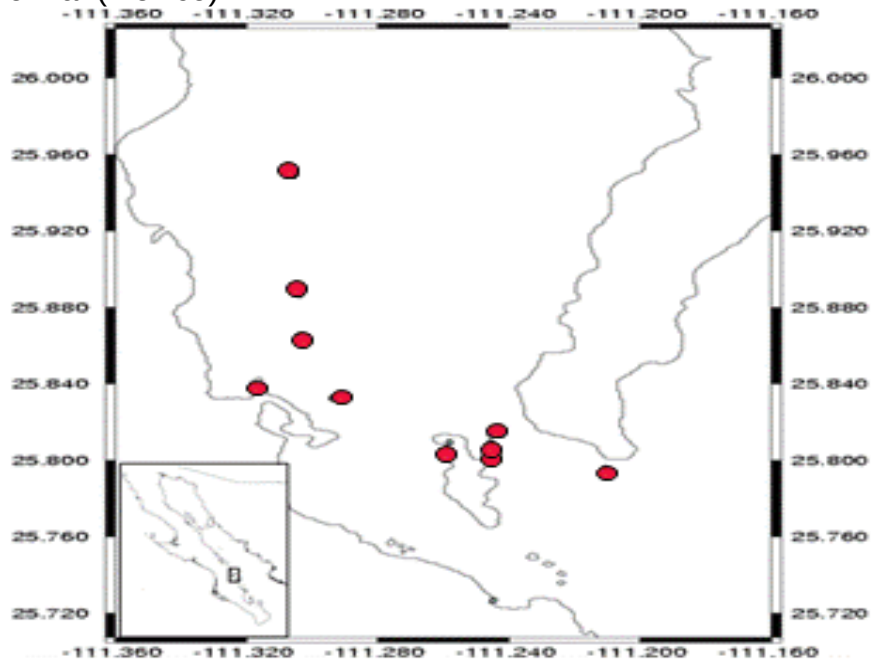


Figura 12. Estaciones de colecta de sedimento en Loreto, (playa Ensenada Blanca, playa Juncalito, Isla Danzantes, Zona A y Zona B), Baja California, México.

5.1.2. Trabajo de Campo

Los sedimentos que se obtuvieron a profundidades de 20 a 300 m se colectaron empleando una draga de acero inoxidable de 12 cm de longitud, Khalsico con adaptaciones hechas por técnicos del Instituto Oceanográfico Scripps. Por otra parte, las muestras con profundidades de 2 a 15 m se colectaron por buceo libre. En la tabla I se encuentran las localidades, el número de sedimentos colectados y el rango de profundidad. Todo el material utilizado para tomar las muestras fue limpiado con etanol al 100%. Después de sacar la draga, la muestra se tomó utilizando una espátula de metal y procurando que el sedimento fuera de la capa más cercana a la superficie (en los primeros 2 centímetros). Cada muestra fue transferida a bolsas estériles, etiquetada previamente y colocadas a 4 °C para ser analizadas lo antes posible.

5.2. Aislamiento de Actinobacterias.

Una vez en el laboratorio las muestras de sedimento se descongelaron y se tomaron sub-muestras de aproximadamente 5 g de sedimento y cada una fue transferida a una caja Petri estéril. Todas las muestras se dejaron secar bajo una campana de flujo laminar durante 24 Hrs. Una vez secas las muestras se maceraron y se inocularon con la técnica de estampado en placa, para lo cual se tomó una esponja estéril de 1 cm de diámetro y se posó sobre el sedimento para después estamparse sobre el medio de cultivo previsto en la caja Petri, enseguida se siguió estampando en forma de círculo hasta cubrir toda la caja

Petri a manera de dilución, de tal manera que el primer círculo estampado contenía mucho más sedimento que el último (Mincer, 2002).

Se seleccionaron seis medios de cultivo para el aislamiento de Actinobacterias (Gontang et al. 2007; Mincer et al. 2002; Ensign 1978):

M1: agar 18 g L⁻¹,

M2: agar 18 g L⁻¹, manitol 0.5 g L⁻¹ y peptona 0.1 g L⁻¹,

M3: agar 18 g L⁻¹, almidón 1.0 g L⁻¹, peptona 0.2 g L⁻¹ y levadura 0.4 g L⁻¹,

M4: agar 18g L⁻¹ manitol 2.5 g L⁻¹ y peptona 1g L⁻¹,

M5: agar 18 g L⁻¹, Manitol 0.5 g L⁻¹ y casa amino ácidos 0.1 g L⁻¹,

M6: agar 18 g L⁻¹, tristona 0.6 g L⁻¹, casitona 1.0 g L⁻¹ y glucosa 0.8 g L⁻¹

Todos los medios se prepararon con agua de mar, además, se les adicionó ciclohexamida (100 µg mL⁻¹) para evitar el crecimiento de hongos y como agente antibacteriano rifampicina (5 µg mL⁻¹) o gentamicina (5 µg mL⁻¹) para impedir el crecimiento de bacterias con tasas de crecimiento rápido y permitir el crecimiento de otras bacterias con tasas de crecimiento lento (Actinobacterias).

De esta manera se contó con 12 variantes de medios de cultivos para aislar las Actinobacterias. Una vez que las colonias de bacterias crecieron (aproximadamente 1 a 4 semanas) se observó la morfología colonial con la ayuda de un estereoscopio y las bacterias que presentaban características propias de Actinobacterias se aislaron y purificaron sobre medio de cultivo A1 (agar 18 g L⁻¹, almidón 10.0 g L⁻¹, peptona 2.0 g L⁻¹, levadura 4.0 g L⁻¹) (Fig. 13).

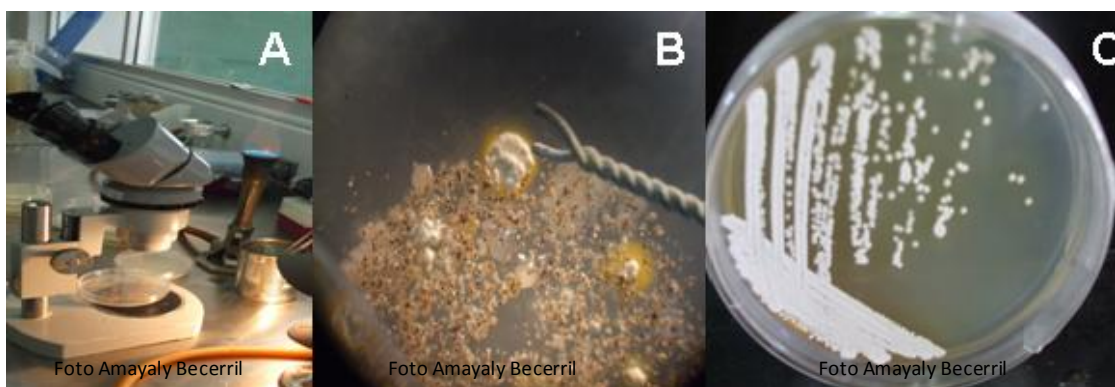


Figura 13. Aislamiento de Actinobacterias. A) Observación de cada colonia con la ayuda de un microscopio estereoscópico B) Aislamiento de la posible colonia de Actinobacterias C) Cepa pura aislada.

5.2.1. Morfología microscópica

Se tomó una asada de una colonia bien definida y se tiñó con la tinción Gram posteriormente se observó la coloración de las células y la morfología microscópica de estas mediante inspección visual en un microscopio óptico.

5.2.3. Reacción Gram

Las cepas aisladas que presentaron características morfológicas propias de las Actinobacterias (filamentosas) se analizaron mediante la reacción Gram, para lo cual se siguió la metodología descrita por Powers (1995).

5.2.3. Formación del cepario de Actinobacterias

Posterior a la identificación según su morfología colonial y microscópica, las cepas puras se codificaron y se preservaron por criogénesis de la siguiente manera: una asada de una colonia de Actinobacteria se creció en 10 mL de medio líquido A1, por 4 días, posteriormente se colocó en glicerol al 80% en tubos eppendorf de 1.5 mL de capacidad y se almacenó a una temperatura de -75 °C para formar parte del primer cepario de Actinobacterias de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC). Para tener una organización de las cepas aisladas se formó una base de datos con la siguiente información para cada una de las cepas: código de la cepa, número de muestra de sedimento, localidad de colecta, fecha de aislamiento, profundidad de la muestra, tipo de muestra, medio de cultivo de aislamiento, método de aislamiento, descripción de la cepa, tipo de hifas, medio en el que se crio preservó, fecha de criopreservación, número de viales criopreservados y número de la caja en donde se guardaron los criopreservados.

5.2.4. Preparación de extractos orgánicos a partir de Actinobacterias

Para acondicionar las Actinobacterias de medio sólido a medio líquido, una colonia bien definida y joven se inoculó en 10 mL de medio líquido A1, se dejó crecer por 3 o 5 días a 25 °C con rotación continua a 215 rpm. Posteriormente, se inoculó en 100 mL de medio líquido A1, y se dejó en agitación a 215 rpm y a un intervalo de temperatura de 25-28 °C, por 8 días. Al finalizar los 8 días se adicionó amberlita XAD7 (20 g L⁻¹ de cultivo) y se agitó por 2 horas, a 100 rpm.

Posteriormente, el cultivo se filtró y la amberlita se colocó con 100 mL de acetona por 2 horas a 100 rpm. Finalmente, el extracto se filtró y se concentró mediante destilación a presión reducida, en un rotaevaporador marca Heidolph Collegiate modelo WBEco. Todos los extractos se almacenaron a 15 °C.

5.3. Búsqueda de Actinobacterias bioactivas

5.3.1. Actividad citotóxica

Cada extracto fue probado contra células de cáncer colorectal HCT-116 a una concentración de 10 mg mL⁻¹ en sulfóxido de dimetilo (DMSO), a partir de la cual se obtuvo la concentración inhibitoria media (IC₅₀) en µg mL⁻¹, empleando un método de dilución y después de 72 horas de incubación se leyó su absorbancia a 490 nm. Se evaluó la cantidad de células cancerígenas que se destruyeron, como causa del efecto del compuesto adicionado. Con estas lecturas se hizo una curva y se obtuvo la concentración letal media (IC₅₀).

5.3.2. Actividad antibiótica

Cada extracto fue probado contra los patógenos *Pseudomona aeuroginosa* y *Proteus vulgaris* empleando la técnica convencional de placa con discos. Cada patógeno fue cultivado en medio líquido agar nutritivo a una concentración de 10⁵ UFC mL⁻¹, se tomó una alícuota de 1 mL y se inoculó de forma masiva sobre medio sólido de agar nutritivo. Posteriormente se colocó el disco de papel filtro (5 mm de diámetro) impregnado del extracto a probar a una concentración de

10 mg mL⁻¹. Las cajas de cultivo se incubaron a 37°C por 24-48 h y se leyó el halo de inhibición.

5.4. Diversidad de Actinobacterias según el 16S ARNr

5.4.1. Purificación de ADN total

Las cepas de Actinobacterias fueron cultivadas en medio líquido A1 a 28 °C, por 5 días o hasta obtener un crecimiento de las bacterias, se tomaron 3 mL de la suspensión y se extrajo el ADN genómico total de cada cepa. El ADN genómico fue extraído usando el kit de extracción de ADN “DNeasy® Blood and Tissue Kit” Cat. No. 69506, de acuerdo con el protocolo del fabricante (Qiagen Corp. Ca. USA).

5.4.2. Determinación de la concentración de ADN total

La concentración de ADN se obtuvo con la ayuda de un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000, obteniendo lectura en un campo de 280 nm, utilizando el buffer AE que se empleó para eluir el ADN como blanco, con 1.6 µl por muestra.

5.4.3. Amplificación del gen 16S ADN ribosomal

Las cepas seleccionadas se identificaron mediante la secuenciación del 16S ADN ribosomal, para lo cual se amplificó de 10 a 50 ng de ADN genómico por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las amplificaciones del 16S ADNr fueron secuenciados usando los cebadores: FC27 (5'-a- 3'

AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y RC1492 (5' -a- 3' TACGGCTACCTTGTTACGACTT), bajo las siguientes condiciones una desnaturalización inicial 95 °C por 15 minutos, seguido por 32 ciclos de 95 °C por 1 min, 61 °C por 1 min y 72 °C por 1 min, seguido por 7 min de extensión a 72 °C. Los productos del PCR se purificaron con un equipo limpiador marca Qiagen QIAquick PCR, de acuerdo a los protocolos proporcionados por el proveedor (Qiagen Inc., Chatsworth, Calif.). Las secuencias fueron realizadas en la compañía SeqXcel, INC. (<http://www.seqxcel.com/>) mediante la técnica BigDye Terminator Cycle Sequencing Chemistry 3.1 utilizando el Analizador Genético ABI Prism 3100 (Applied Biosystem).

5.4.4. Análisis Filogenéticos

Las dos secuencias individuales del 16S ARNr de cada cepa fueron ensambladas para dar un total de 1300 nucleótidos, posteriormente fueron comparadas con las secuencias disponibles en la base de datos BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) función contenida de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (Altschul et al. 1990), Por otra parte, las secuencias fueron alineadas usando el programa ClustalX (Staley y Ta 1985) y éstas fueron importadas dentro del programa Bioedit (Hall y Brown 2001) con una alineación manual. El árbol filogenético fue construido con el algoritmo “neighbor-joining” (vecino más cercano) con 10000 réplicas, usando el programa MEGA4 (Tamura et al. 2007), utilizando un segmento de 1300 pares de bases.

Las secuencias obtenidas del 16S ARNr fueron depositadas en la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/index.html>) con los números de accesos del HQ873926 al HQ873952, del HQ877423 al HQ877448 y del HQ326147 al HQ326156.

5.4.5. Unidades Taxonómicas Operacionales (UTOs)

Las secuencias de los genes del 16S ARNr (1300 bp) fueron alineadas con UTOs basados en un 100, 99 y 98% de identidad, cada UTO fue agrupada con cepas que comparten un 99% de similitud en sus secuencias 16S ARNr. Las secuencias fueron usadas para generar árboles filogenéticos.

5.5. Genes Biosintéticos del Metabolismo Secundario

5.5.1. Amplificación de las secuencias cetosintetasa (KS) por PCR y clonación

La amplificación de las secuencias KS por PCR se obtuvo a partir de 20-50 ng mL⁻¹ del ADN total, empleando los cebadores degenerados PKSRb (5'-GTSCCSGTSCCGTGSGCCTCSA-3') y PKSFa (5'-CCSCAGSAGCGCSTTTCTGGA-3') con un programa que inició con una desnaturalización inicial a 95 °C por 15 minutos, seguido por 1 ciclo de 95 °C por 1 min, 65 °C por 1 min y 72 °C por 1 min, seguidos por 31 ciclos de 95 °C por 1 min, 62 °C por 1 min y 72 °C por 1 min, seguido por 7 min de extensión a 72 °C. Posteriormente el producto de PCR se purificó por extracción de gel con

un equipo limpiador marca Qiagen QIAquick PCR, de acuerdo a los protocolos proporcionados por el proveedor (Qiagen Inc., Chatsworth, Calif.).

El producto de PCR purificado fue ligado al vector plasmídico “plasmid vector pCR® 2.1-TOPO®”, el cual se usó para la transformación de células químicamente competentes “One Shot® Mach1™ - T1®” usando “Topo TA® cloning kit” de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen). Las clonas transformadas fueron identificadas usando la selección blanco-azul (disrupción del gen β -galactosidasa) entre las células transformadas que no poseen o poseen el inserto respectivamente, e inoculados en tubos Falcon de 10 mL conteniendo 3 mL de caldo LB con kanamicina como antibiótico a una concentración de 50 g mL⁻¹.

El ADN plasmídico fue extraído usando el “QiaPrep® MiniPrep extraction kit”, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen, Cat. No; 27106). El ADN plasmídico fue sujeto a un análisis de enzimas de restricción BstX I (New England BioLabs) y el producto fue corrido por electroforesis en gel de agarosa al 1% para confirmar la presencia del inserto con el tamaño correcto. Los plásmidos que contenían insertos de las secuencias KS fueron secuenciados comercialmente (SEQXCEL) usando el cebador M13 incluido en el vector (Invitrogen). Las secuencias KS obtenidas fueron depositadas en la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/index.html>) con los números de accesos del HQ877411 al HQ877422.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. Abundancia de Actinobacterias cultivables

Se colectaron 133 muestras de sedimentos a profundidades de 0 a 300 m en diferentes localidades la Bahía de Todos Santos y del Golfo de California. De donde se aislaron un total de 1523 cepas con características morfológicas propias de Actinobacterias, de las cuales el 946 fueron criopreservadas y codificadas para formar parte del cepario de Actinobacterias. En promedio se pudieron aislar entre 3.1 a 4.5 colonias de Actinobacterias en las localidades S1, S2, S4 y S6, sin embargo, en las localidades S3, S5, S6, S7 y S8 se ve un incremento en el número de cepas aisladas por cada muestra de sedimento de 7.2 a 38.3 (Tabla I), esto se puede explicar debido a que en los sitios S1, S2, S4 y S5 son muestras que se tomaron pegadas a la costa a profundidades entre 0 y 20 m como máximo, en donde hubo un crecimiento de bacterias mucosas Gram negativas a partir del segundo día de cultivo, por lo cual las Actinobacterias competían por espacio en las cajas y nutrientes. No así en los sitios S3, S7 y S8 que fueron tomados alejados de la costa y la presencia de bacterias mucosas fue escasa o nula.

Las Actinobacterias cultivables se clasificaron en tres grupos de acuerdo con su morfología colonial y su requerimiento de agua de mar para crecer. El Grupo I (GI) estuvo conformado por Actinobacterias que presentaron una morfología colonial de micelio sustrato y no requerían agua de mar para crecer. En el Grupo II (GII) las Actinobacterias presentaron una morfología colonial de micelio sustrato y requerían agua de mar para crecer. En el grupo III (GIII) presentaron

una morfología colonial con presencia de hifas aéreas bien desarrolladas y que no requerían de agua de mar para crecer.

Tabla I. Número de Actinobacterias aisladas a partir de sedimento marino colectado en el Golfo de California y en la Bahía de Todos Santos.

Localidad		Código de la localidad (profundidad)	Número de muestras	Cepas aisladas (Criopreservadas)	Cepas Por muestra
Bahía de Todos Santos		S1 (0-20m)	7	26 (26)	3.7
Bahía de San Felipe		S2 (10 m)	8	25 (25)	3.1
Bahía de Los Ángeles		S3 (20 m)	9	108 (55)	12
Bahía de Concepción		S4 (0-15 m)	41	185 (166)	4.5
Loreto	Playas	S5 (0-15 m)	32	415 (80)	12.9
	Playas de islas	S6 (0-10 m)	11	80 (58)	7.2
	Zona A	S7 (200 m)	11	147 (125)	13.35
	Zona B	S8 (300 m)	14	537(411)	38.3
Total			133	1523 (946)	

6.1.1. Grupo I. Tipo micelio sustrato, no requieren de agua de mar para crecer (GI)

Este grupo está formado por las Actinobacterias cuya morfología colonial presentó hifas aéreas no desarrolladas tipo micelio sustrato, de consistencia sólida no mucosas, presentaron pigmentación de diferentes tonalidades de naranja claro a oscuro, violeta, café y blancas, características morfológicas propias de la familia *Micromonosporaceae* (Mincer et al. 2002; Jensen et al. 1991). Por sus características morfológicas a este grupo se les nombró como Actinobacterias tipo “micelio sustrato que no requieren agua de mar para crecer”.

De este grupo se observaron 246 cepas que corresponden a un 16.1% del total de Actinobacterias cultivables de las diferentes localidades. El mayor porcentaje

de recuperación por localidad fue en San Felipe (48%, sitio S2) y Bahía de los Ángeles (40.2%, sitio S3), en contraste con playas de Loreto en donde se aisló el 2.3% del total de esta localidad (sitio S5) (Fig. 14). Al considerar el total de Actinomicetos de este grupo (GI), se encontró que en la zona B de Loreto (sitio S8) se aisló la mayor cantidad de estos actinomicetos (51.8%) en comparación con las localidades de playas de Loreto (4%, sitio S5) y Bahía Todos Santos (3.2%, sitio S1) respecto al total aislado de este grupo (Fig. 15).

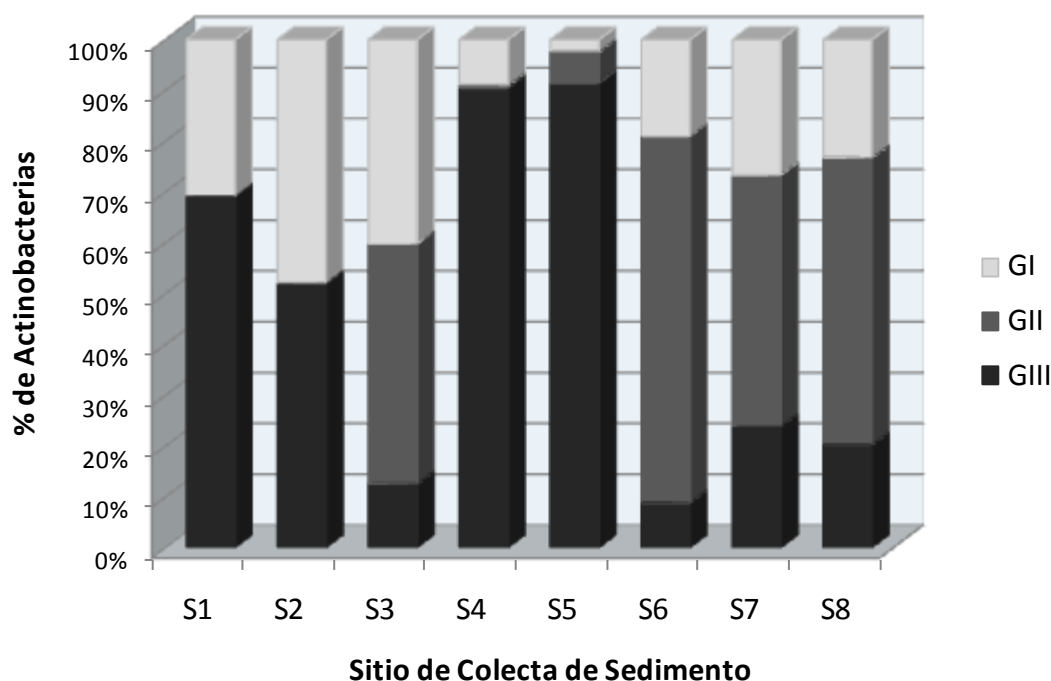


Figura 14. Porcentaje de Actinobacterias aisladas con relación a la localidad de sedimento. GI= Actinobacterias tipo micelio sustrato que no requieren agua de mar para crecer. GII= Actinobacterias tipo micelio sustrato que requieren agua de mar para crecer. GIII= Actinobacterias tipo hifas aéreas. S 1= Bahía de Todos Santos, S2= San Felipe, S3= Bahía de los Ángeles, S4= Bahía Concepción, S5= Playas de Loreto, S6= alrededor de Isla Danzantes, S7= Zona A de Loreto y S8= Zona B de Loreto

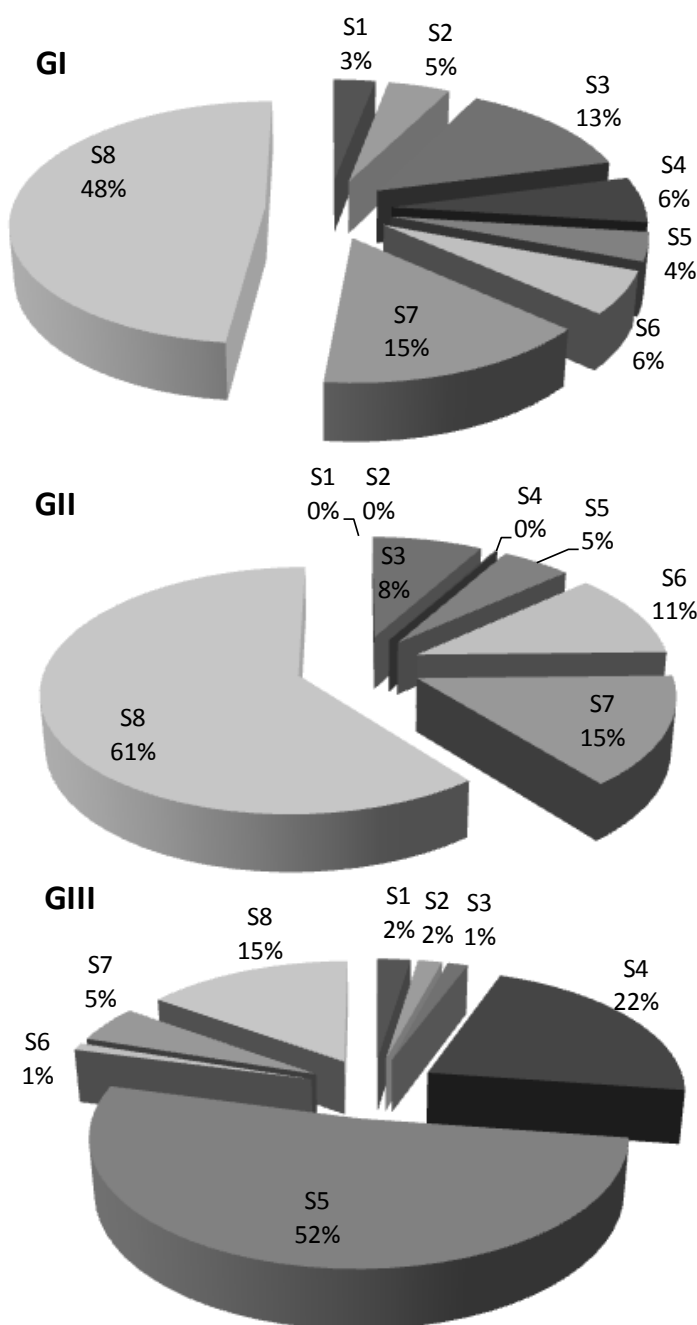


Figura 15. Abundancia de aislados por grupo de Actinobacterias. Se muestra el número total de aislados de cada grupo por estación de muestreo. GI= Actinobacterias tipo micelio sustrato que no requieren agua de mar para crecer. GII= Actinobacterias tipo micelio sustrato que requieren agua de mar para crecer. GIII= Actinobacterias tipo hifas aéreas. S1= Bahía de Todos Santos, S2= San Felipe, S3= Bahía de los Ángeles, S4= Bahía Concepción, S5= alrededor de Isla Danzantes, S6= Playas de Loreto, S7= Zona A de Loreto, S8= Zona B de Loreto.

6.1.2. Grupo II. Tipo micelio sustrato que requieren de agua de mar para crecer (GII)

Este grupo está formado por las Actinobacterias que requieren de agua de mar para crecer, cuya morfología colonial es similar a la presentada en el grupo GI con presencia de hifas tipo micelio sustrato, de consistencia sólida, presentaron pigmentación blanca y diferentes tonalidades de naranja claro a oscuro con esporas negras, violeta y café. Por sus características morfológicas a este grupo se les nombró como Actinobacterias tipo “micelio sustrato que requieren agua de mar para crecer”.

De este grupo se observaron 507 cepas que corresponden a un 33.3% del total de Actinobacterias cultivables de las diferentes localidades en el Golfo de California desde Bahía de los Ángeles hasta Loreto, particularmente en la Bahía de Loreto (sitio S8) se aislaron 60.7% (308 cepas) de Actinobacterias del total del grupo II (Fig. 15), cabe destacar que 17 cepas presentaron una morfología colonial solida color blanco y se pudieron recuperar en Bahía de Loreto en las zonas A y B (sitios S7 y S8), el resto presentó una coloración con deferentes tonalidades de naranja a negro característica propias del género *Salinispora* (Maldonado et al. 2005). Cabe destacar que el mayor porcentaje de recuperación por localidad fue en Bahía de los Ángeles (47.2%, sito S3), Isla Danzantes (72.1%, Sitio S6), Bahía de Loreto en las zonas A y B (49.3%, sitio S7; 56.4%, sitio S8) (Fig. 14).

6.1.3. Grupo III. Tipo hifas aéreas (GIII)

El grupo de Actinobacterias tipo hifas aéreas se conformó por las bacterias cuya morfología colonial presentaba colonias elevada, convexa, con presencia de hifas aéreas bien desarrolladas y micelio ramificado con espora que nace del micelio, con una textura aterciopelada, características que son comunes para la familia *Streptomycetaceae* (Anderson y Wellington 2001; Lo et al. 2002; Sujatha et al. 2005). De este grupo se observaron 770 cepas que corresponden a un 50.6% del total de Actinobacterias cultivables. En las playas de Loreto (S5) se aisló la mayor cantidad de este grupo de actinomicetos (51.8%) en comparación con los sedimentos de Bahía de los Ángeles (S3) y alrededor de la Isla Danzantes (S6) en donde se obtuvo menos del 1% de aislamiento (Fig. 15). En las muestras tomadas entre 0 a 20 m se obtuvo el mayor porcentaje de recuperación por localidad, con un 90% en Bahía Concepción (sitio S5) y playas de Loreto (sitio S5), un 69% en Bahía Todos Santos (sitio S1) y con un 52% en San Felipe (Sitio S2) (Fig. 14).

En este trabajo las Actinobacterias aisladas son consideradas como marinas por haberlas aislado del sedimento marino, sin embargo, cabe destacar que las del grupo II son consideradas como autóctonas marina por requerir agua de mar para crecer (Jensen 2010). Sin embargo, en diferentes trabajos se discute el estado autóctono marino de las Actinobacterias que no requieren de agua de mar para crecer (ej. GI y GIII), se ha propuesto que las esporas fueron transportadas durante muchos años de la superficie de los continentes hacia el

mar, adaptándose fisiológicamente para encontrarse biológicamente activas en el océano (Mincer et al. 2002), en este sentido las Actinobacterias GI y GIII fueron abundantes (100-91.4% de abundancia por localidad) en sistemas marinos costeros, como Bahía Todos Santos, San Felipe, Bahía Concepción y Playas de Loreto (localidades S1, S2, S4 y S5, respectivamente) (Fig. 15), estas localidades están influenciadas por descargas derivadas de la actividad antropogénica, con descargas después de las lluvias de invierno y el aporte eólico desde el continente, por lo anterior, no se puede afirmar que estas Actinobacterias son autóctonas marinas o residentes del sedimento marino. Por otra parte, en el aislamiento de Actinobacterias se empleó la técnica de estampado en placa del sedimento, esta técnica sobreestima la abundancia de especies que forman grandes cantidades de esporas (Davet y Rouxel, 2000) y no hacen distinción entre las Actinobacterias que crecen activamente en el sedimento marino y las que se encuentran en estado de latencia a manera de esporas u otras estructuras de resistencia que han sido transportadas, por lo que, tampoco se podría asegurar que estas especies se encuentren creciendo activamente en el sedimento marino.

6.2. Recuperación de Actinobacterias en función del medio de cultivo.

Las Actinobacterias de los GI y GII se empezaron a observar después de la quinta semana de incubación en los medios que contenía gentamicina y hasta la octava semana en los medios con rifampicina y dependiendo del medio de cultivo empleado para su aislamiento. Estas colonias fueron reconocidas por la ausencia de hifas aéreas y su pigmentación de diferentes tonalidades desde blanco, naranja, violeta, café hasta negro. En los medio M1 y M2 por ser pobres en nutrientes, las colonias se observaron como un micelio sustrato plano muy tenue (dentro del agar) y con una coloración entre negro a café, en contraste con los otros medios (M3-6) en donde las colonias presentaron una acumulación de micelio sustrato en la superficie y dentro del agar, la producción de esporas se observó cuando iba cambiando la tonalidad de la superficie de la colonia de naranja a negro (Fig. 16). El mayor porcentaje de recuperación del total de Actinobacterias por grupo se obtuvo en los medios que contenían rifampicina. Para GI se obtuvo un 19% en M1R, un 24% en M2R y un 22% en M3R, para el GII se obtuvo en los medios M2R (20%) y M3R (24%) (Fig. 17).

Por otra parte, las Actinobacterias pertenecientes a GIII empezaron a crecer a partir de la primera semana en los medios de cultivo que contenían gentamicina y a partir de la segunda y tercera semana en los medios de cultivo con rifampicina, los medios M3R y M3G permitieron el aislamiento con mayor porcentaje de recuperación (23% y 20.3% respectivamente) (Fig. 17).



Figura 16. Imagen de colonias de Actinobacterias en diferentes medios de cultivo. A) Medio rico en nutrientes (M3G) se observa las colonias de Actinobacterias del GII, B) Medio pobre en nutrientes (M1G) se observa una colonia de Actinobacteria del GII, C) Medio rico en nutrientes (M3G) se observa una colonia naranja del GI y dos colonias blancas del GIII.

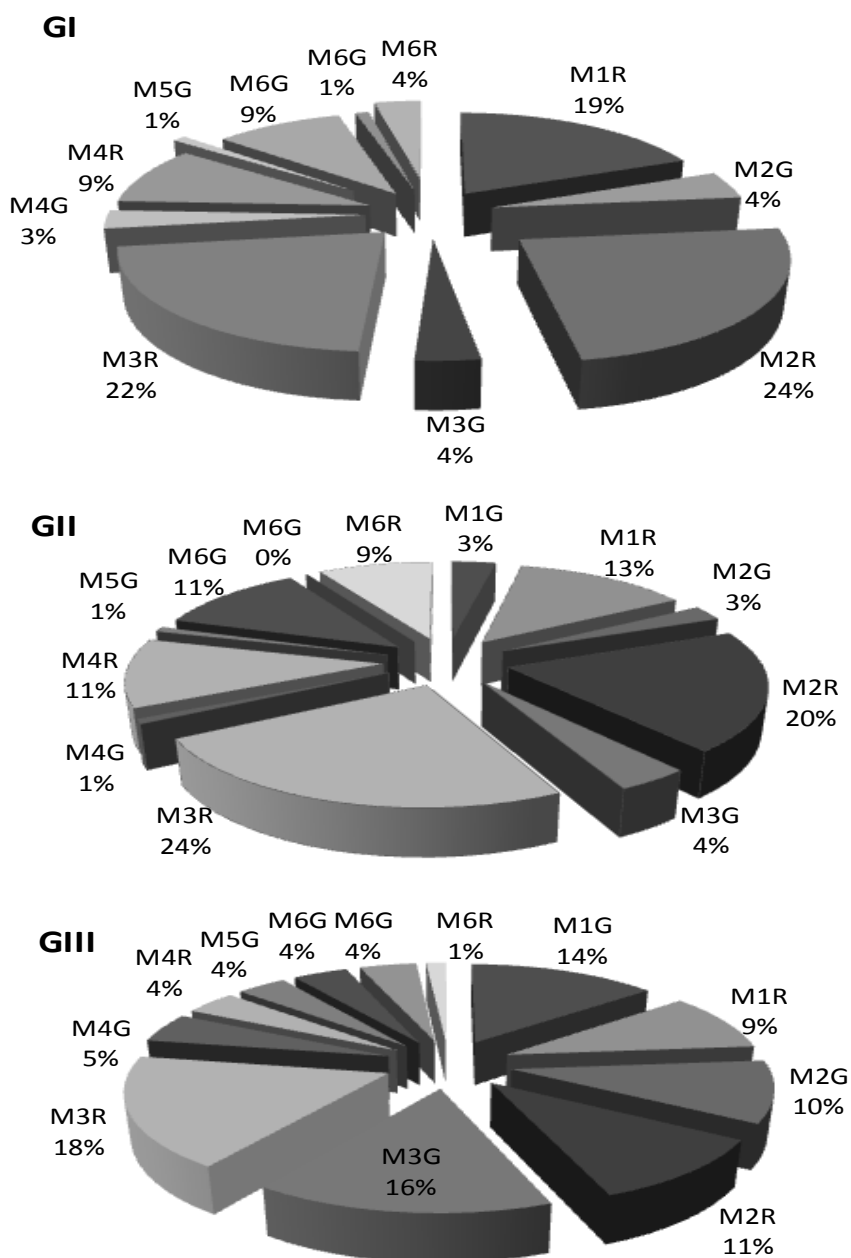


Figura 17. Porcentaje de recuperación de Actinobacterias en función del medio de cultivo. GI= Actinobacterias tipo micelio sustrato que no requieren agua de mar para crecer. GII= Actinobacterias tipo micelio sustrato que requieren agua de mar para crecer. GIII= Actinobacterias tipo hifas aéreas. G= gentamicina, R= rifampicina, M= medio, M1 (agar, 18g/L), M2 (agar 18 g L⁻¹, manitol 0.5 g L⁻¹, peptona 0.1 g L⁻¹), M3 (agar 18 g L⁻¹, almidón 1.0 g L⁻¹, peptona 0.2 g L⁻¹, levadura 0.4 g L⁻¹), M4 (agar 18 g L⁻¹, manitol 2.5 g L⁻¹, peptona 1 g L⁻¹), M5 (agar 18 g L⁻¹, Manitol 0.5 g L⁻¹, casaamino ácidos 0.1 g L⁻¹), M6 (agar 18 g L⁻¹, tristona 0.6 g L⁻¹, casitona 1.0 g L⁻¹, glucosa 0.8 g L⁻¹).

Es interesante destacar que se observaron 33 morfologías coloniales en las Actinobacterias del GIII, presentando micelio con diferentes colores desde blanco, amarillo, verde, rojo, azul, gris, entre otros, además de la presencia de exudados y/o la pigmentación del agar desde amarillo, rojo y negro. El número de morfologías coloniales obtenidas con respecto al medio varió dependiendo del tipo de sedimento, por ejemplo en las muestras obtenidas de la localidad S4 se obtuvo una mayor diversidad de morfologías con el medio M3G, sin embargo, para las muestras de la localidad S8 el mejor medio para asilar diferentes tipos fue el M3R (Fig. 18).

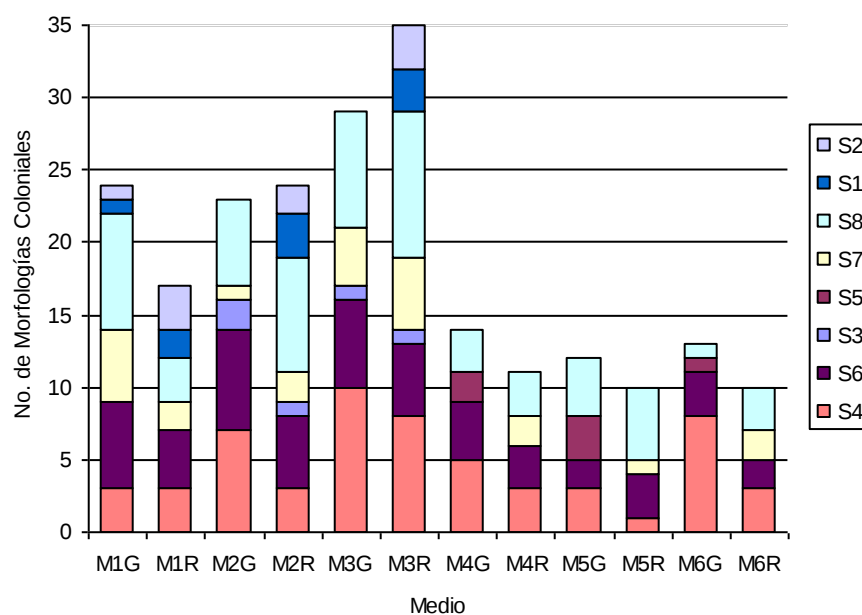


Figura 18. Número de morfologías del grupo III encontradas respecto al medio de cultivo y el sitio de colecta de sedimento. S1= Bahía de Todos Santos, S2= San Felipe, S3= Bahía de los Ángeles, S4= Bahía Concepción, S5= alrededor de Isla Danzantes, S6= Playas de Loreto, S7= Zona A de Loreto, S8= Zona B de Loreto.

6.3. Diversidad de Actinobacterias cultivables

La diversidad de Actinobacterias se obtuvo con las secuencias parciales del gen del 16S ARNr obtenidas a partir de 148 cepas incluyendo 60 del tipo-*Salinispora*. Las cepas fueron seleccionadas según su morfología colonial sobre medio de cultivo A1 y su requerimiento de agua de mar. En total, se analizaron 95 cepas que se obtuvieron a 200- 300 m, el resto fueron obtenidas de 0 – 20 m de profundidad.

6.3.1. Unidades Taxonómicas Operacionales (UTOs)

La diversidad por unidades taxonómicas operacionales (UTOs) empleando una identidad de secuencias de 100% fue de 55 taxones, de estos, 42 correspondieron a taxones nuevos. Al disminuir el porcentaje de similitud a un 99% se encontraron 9 UTOs nuevos y a un 98% de similitud solo se encontró tres UTOs nuevos, los cuales pueden representar nuevos taxones. Un UTO nuevo que requiere agua de mar para crecer (cepa AMS37) presentó una identidad de secuencia $\leq 95.5\%$ al género *Streptomyces*. Los UTOs nuevos encontrados correspondieron a secuencias obtenidas de cepas de Actinobacterias colectadas a 200 y 300 m de profundidad. Al comparar las secuencias con las reportadas en el NCBI como de origen marino se encontraron 7, 11 y 9 UTOs con un 100, 99 y 98% de identidad respectivamente. Cabe destacar que de las secuencias reportadas de origen marino solo tres han sido descritas formalmente, las especies *Salinispora arenicola* (Maldonado et al. 2005), *Saccharomonospora marina* (Liu et al.

2010) y *Micromonospora krabiensis* (Jongrungruangchok et al. 2008). El resto de las secuencias reportadas de origen marino no tienen descripción de especie, únicamente de género y con un 98% de similitud se pueden considerar como taxones nuevos (Fig. 19 y 20).

Por otra parte, en las playas de la Bahía de Loreto y Bahía de Todos Santos se seleccionaron 22 cepas de Actinobacterias las cuales presentaron un 99.5% de similitud a secuencias del gen 16S ARNr de Actinobacterias reportadas de origen terrestre relacionadas a los géneros *Streptomyces* y *Micromonospora*. Esto es debido probablemente a que muchas de las Actinobacterias aisladas en localidades cercanas a la costa fueron transportadas del continente al mar como se ha visto en otros estudios (ej. Gontang et al. 2007).

Con base en el análisis de BLAST de las secuencias de genes del 16S ARNr de 139 cepas secuenciadas se determinó que estaban relacionadas con 9 géneros *Streptomyces* (43 cepas), *Salinispora* (60 cepas), *Nocardia* (1 cepa) , *Micromonospora* (17 cepas) , *Actinomadura* (4 cepas), *Verrucospora* (4 cepas), *Nonomuraea* (1 cepa), *Nocardiopsis* (1 cepa) y *Saccharomonospora* (8 cepas). En la tabla II se muestra la relación de las cepas representativas de Actinobacterias aisladas y sus vecinos filogenéticos más cercanos. Cabe destacar que Bahía de Todos Santos solo se pudo recuperar Actinobacterias relacionada a los géneros *Streptomyces*, *Nocardia* y *Micromonospora*; y en el Golfo de California las se relacionaron a los géneros *Streptomyces*, *Salinispora*, *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Verrucospora*, *Nonomuraea*, *Nocardiopsis* y *Saccharomonospora*.

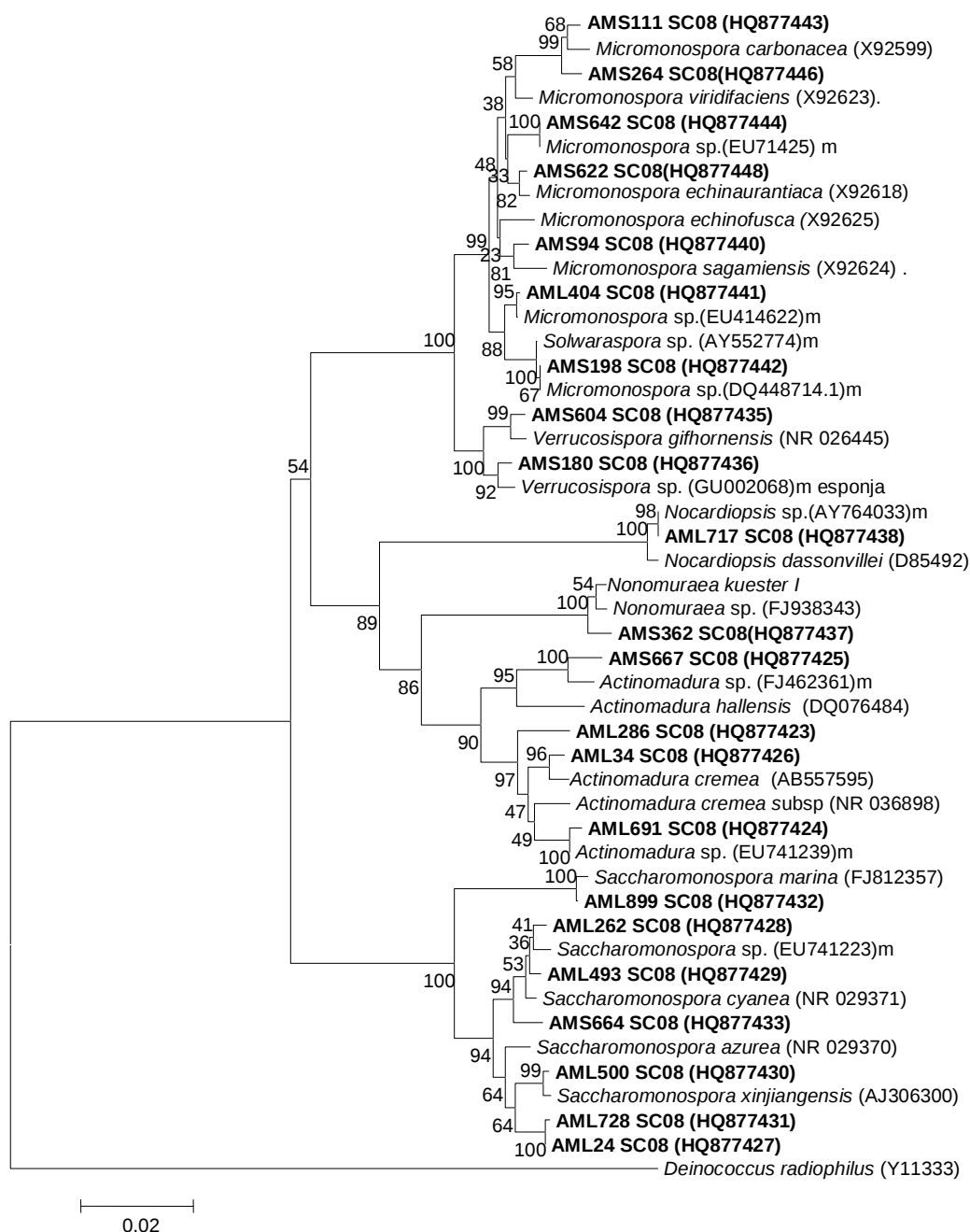


Figura 19. Árbol filogenético de cepas de Actinobacterias representativas de los géneros *Nocardia*, *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Verrucosispora*, *Nonomuraea*, *Nocardiopsis* y *Saccharomonospora*; en negritas se resalta las cepas aisladas. El árbol se generó usando el método del vecino más cercano (Neighbor-Joining), con 1000 réplicas. Con un total de 1300 bases nucleotídicas del gen 16S ARNr. El nombre de la especie está seguido por el número de acceso del GenBank (de las secuencias representativas). m = cepas aisladas de ambiente marino, SC08 = Mar de Cortés aislada en el año 2008.



Figura 20. Árbol filogenético de cepas representativas de Actinobacterias relacionadas con el género *Streptomyces*. En negritas se resalta las cepas aisladas. El árbol se generó usando el método del vecino más cercano (Neighbor-Joining), con 1000 réplicas. Con un total de 1300 bases nucleotídicas del gen 16S ARNr. El nombre de la especie está seguido por el número de acceso del GenBank (de las secuencias representativas). m = cepas aisladas de ambiente marino, SC08 = Mar de Cortés aislada en el año 2008.

Tabla II. Identidad de secuencias más cercanas a las Actinobacterias aisladas, después de la comparación de secuencias con el BLAST de NCBI. *= requiere de agua de mar para crecer, SM = Sedimento marino, EM= esponja marina

Cepa representativa (No. de acceso al GenBank)	Vecino filogenético más cercano (No. de acceso al GenBank)	% Identidad	Fuente
AMS515 (HQ873952)*	<i>Salinispora arenicola</i> (AY040619)	99.92	SM
AMS178 (HQ873947)*	<i>Salinispora pacifica</i> (DQ224161)	99.8	SM
AMS301 (HQ873948)*	<i>Salinispora pacifica</i> (DQ224161)	99.7	SM
AMS365 (HQ873949)*	<i>Salinispora pacifica</i> (DQ224161)	100	SM
AMS360 (HQ877439)*	<i>Salinispora arenicola</i> (AY040619)	99.92	SM
AMS198 (HQ877442)	<i>Micromonospora</i> sp. (DQ448714)	100	SM
AMS111 (HQ877443)	<i>Micromonospora carbonacea</i> (X92599)	99.38	Suelo
AMS94 (HQ877440)	<i>Micromonospora sagamiensis</i> (X92624)	98.91	Suelo
AML404 (HQ877441)	<i>Micromonospora</i> sp. (EU414622)	99.92	SM
AMS264 (HQ877446)	<i>Micromonospora carbonacea</i> (X92599)	99.07	Suelo
AMS642 (HQ877444)	<i>Micromonospora</i> sp. (EU714254)	100	SM
AMS622 (HQ877448)	<i>Micromonospora viridifaciens</i> (X92623)	99.01	Suelo
AML717 (HQ877438)	<i>Nocardiosis</i> sp. (AY764033)	100	SM
AMS180 (HQ877436)	<i>Verrucospora</i> sp. (GU002068)	99.38	EM
AMS604 (HQ877435)	<i>Verrucospora gifhornensis</i> (NR_026445)	99.45	Suelo
AMS362 (HQ877437)	<i>Nonomurea</i> sp. (FJ938343)	99.44	Suelo
AMS667 (HQ877425)	<i>Actinomadura</i> sp. (FJ462361)	98.84	SM
AML286 (HQ877423)	<i>Actinomadura cremea</i> subsp. <i>cremea</i> (NR_036898)	98.15	Suelo
AML691 (HQ877424)	<i>Actinomadura</i> sp. (EU741239)	99.84	SM
AML34 (HQ877426)	<i>Actinomadura cremea</i> (AB557595)	99.3	Suelo
AML899 (HQ877432)	<i>Saccharomonospora marina</i> . (FJ812357)	99.54	SM
AML24 (HQ877427)	<i>Saccharomonospora azurea</i> (NR_029370)	98.92	Suelo
AMS664 (HQ877433)	<i>Saccharomonospora</i> sp. (EU741223)	98.99	SM
AML262 (HQ877428)	<i>Saccharomonospora cyanea</i> (NR_029371)	99.53	Suelo
AML493 (HQ877429)	<i>Saccharomonospora cyanea</i> (NR_029371)	99.61	Suelo
AML500 (HQ877430)	<i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> (AJ306300)	99.76	Suelo
AML728 (HQ877431)	<i>Saccharomonospora azurea</i> (NR_029370)	98.84	Suelo
AML732 (HQ873930)	<i>Streptomyces atrovirens</i> (AB184639)	99.84	Suelo
AML861 (HQ873926)	<i>Streptomyces</i> sp. (EU714257)	99.77	SM
AML473 (HQ873927)	<i>Streptomyces</i> sp. (EU714257)	99.76	Suelo
AML60 (HQ873929)	<i>Streptomyces</i> sp. (EU714257)	99.63	SM
AML250 (HQ873928)	<i>Streptomyces</i> sp. (EU214927)	99.5	SM
AML554 (HQ873941)	<i>Streptomyces</i> sp. (EU214927)	99.05	S SM
AML883 (HQ873945)	<i>Streptomyces</i> sp. (AY464541)	99.13	SM
AML828 (HQ873939)	<i>Streptomyces</i> sp. (EU214914)	99.64	SM
AML916 (HQ873935)	<i>Streptomyces</i> sp. (HQ585123)	99.28	SM
AML960 (HQ873942)	<i>Streptomyces</i> sp. (EU214950)	99.49	SM
AML581 (HQ873934)	<i>Streptomyces</i> sp. (DQ416188)	99.92	Manglar
AML754 (HQ873932)	<i>Streptomyces</i> sp. (EF550512)	99.85	Manglar
AMS37 (HQ873950)*	<i>Streptomyces</i> sp. (EF058199)	95.43	SM
AMS578 (HQ873940)	<i>Streptomyces</i> sp. (EF551062)	98.36	SM

Al comparar la morfología colonial de las cepas sobre medio de cultivo A1 con el análisis filogenético según el 16S del ARNr se encontró que las Actinobacterias GI tipo micelio sustrato que no requerían agua de mar para crecer (20 cepas) se relacionaron a 3 géneros; de estas; el 75% fueron *Micromonospora*, el 20% a *Verrucosisspora*, y 5% a *Nonomuraea*. De 63 cepas del GII (micelio sustrato que requieren agua de mar para crecer) el 95.2% eran de colores naranja a negro y se relacionaron al género *Salinispora* y el 4.7% de color blanco se relacionaron al género *Streptomyces*. Las Actinobacterias del GIII (56 cepas con hifas bien desarrolladas), tuvieron una relación filogenética a cuatro géneros; 76.8% se relacionaron al género *Streptomyces*, 7.1% a *Actinomadura*, 1.7% a *Nocardiopsis* y el 4.2% a *Saccharomonospora* (Tabla III).

Tabla III. Abundancia, afinidad genética y UTOs de cepas de Actinobacterias. Los UTOs están delimitados por un 100% a un 98% de identidad de las secuencias del gen 16S ARNr (1300 pb). * = requieren agua de mar para crecer. GI= morfología colonial con ausencia de hifas aéreas solo con micelio sustrato. GII= morfología colonial con presencia de hifas aéreas bien desarrolladas. N= nuevo, M= marino.

Género	Morfología colonial	# de cepas	UTOs								
			100%			99%			98%		
			Total	N	M	Total	N	M	Total	N	M
<i>Salinispora</i>	GI	60	5*	2*	2*	1*	-	1*	1*	-	1*
<i>Micromonospora</i>	GI	17	10	7	1	8	-	2	2	-	-
<i>Nocardiopsis</i>	GII	1	1	-	-	1	-	-	1	-	-
<i>Saccharomonospora</i>	GII	8	8	8	-	5	2	1	3	-	1
<i>Streptomyces</i>	GII	43	32	27	3	15	7	6	13	1*	9
<i>Verrucosisspora</i>	GI	4	3	2	1	3	1	1	2	-	-
<i>Nonomuraea</i>	GI	1	1	-	-	1	-	-	1	-	-
<i>Nocardia</i>	GI	1	1	-	-	1	-	-	1	-	-
<i>Actinomadura</i>	GII	4	4	4	-	4	2	1	4	2	1
Total		136	65	50	7	48	12	11	27	3	9

6.3.2. Diversidad de Actinobacterias que requieren agua de mar para crecer

Se encontraron seis UTOs de Actinobacterias que requieren agua de mar para crecer, relacionados a los géneros *Salinispora* y *Streptomyces*. Lo que sugiere que estas bacterias están adaptadas a las condiciones de salinidad del ambiente marino.

El filotipo relacionado al género *Streptomyces* (cepas AML982, AML37 y AML961) representó un UTO con un 95.5% de similitud a secuencia del 16S ARNr a la cepa marina CNH990 (No. acceso EF058199) aislada del sedimento marino a 20 m de profundidad localizado a 5 km al este de Cabo San Lucas, en el Golfo de California, con una similitud menor al 95% a la cepa marina CNS730 (No. de acceso EU21953), codificada como MAR2 y aislada de sedimento marino de La Jolla, San Diego, Ca., así como a las especies *S. marina*, *S. aviercenniea*, *S. specialis*, *S. hainanensis*, entre otras reportadas en el NCBI (Fig. 21).

Los UTOs del género *Salinispora* se encontraron distribuidas desde la Bahía de los Ángeles hasta Bahía de Loreto a diferentes profundidades lo cual da una clara evidencia de su distribución cosmopolita en el Golfo de California. Cabe destacar que de 60 cepas secuenciadas de este género, el 88.3% pertenecieron a la especie *S. arenicola* y el 11.6% a la especie "*S. pacifica*". Las cepas relacionadas *S. arenicola* presentaron un 99.9% de identidad de secuencia del 16S ARNr a *S. arenicola* cepa estándar (CNS-205, No. acceso

CP000850) (Maldonado et al. 2005), y un 100% de similitud a *S. arenicola* secuencia tipo 'A' y 'B' (Jensen y Mafnas 2006; Maldonado et al. 2009), cabe destacar que *S. arenicola* ha sido aislada en sedimentos tropicales y subtropicales, como son en los sedimentos de Bahamas, Islas Virginias, Palau, Mar Rojo, Guam, Fiji (Jensen y Mafnas 2006) y los filotipos 'A' y 'B' solo se han aislado en el Golfo de California. *S. arenicola* filotipo 'A' fue el más abundante del género *Salinispora*, representando un 86.6% (52 cepas) de 60 cepas de *Salinispora* examinadas en este estudio.

Por otra parte, siete cepas relacionadas a la especie "*S. pacifica*" fueron aisladas por primera vez en el Golfo de California. Las cepas de "*S. pacifica*" formaron tres UTOs, con una diversidad intraespecífica de 3 nucleótidos inter-cambiados en el 16S ARNr. De estos UTOs uno presentó un 100% de similitud a "*S. pacifica*" (secuencia estándar, CNR143, No. acceso DQ092624), otro taxón 100% de identidad a "*S. pacifica*" secuencia tipo 'C' aislada en Fiji (comunicación personal K.C. Freel) y el tercer taxón con un 99.84 % de similitud a "*S. pacifica*" (secuencia tipo estándar, CNR143, No. acceso DQ092624) se consideró como un nuevo UTO a cual se nombró como "*S. pacifica*" secuencia tipo 'M' (Fig. 22).

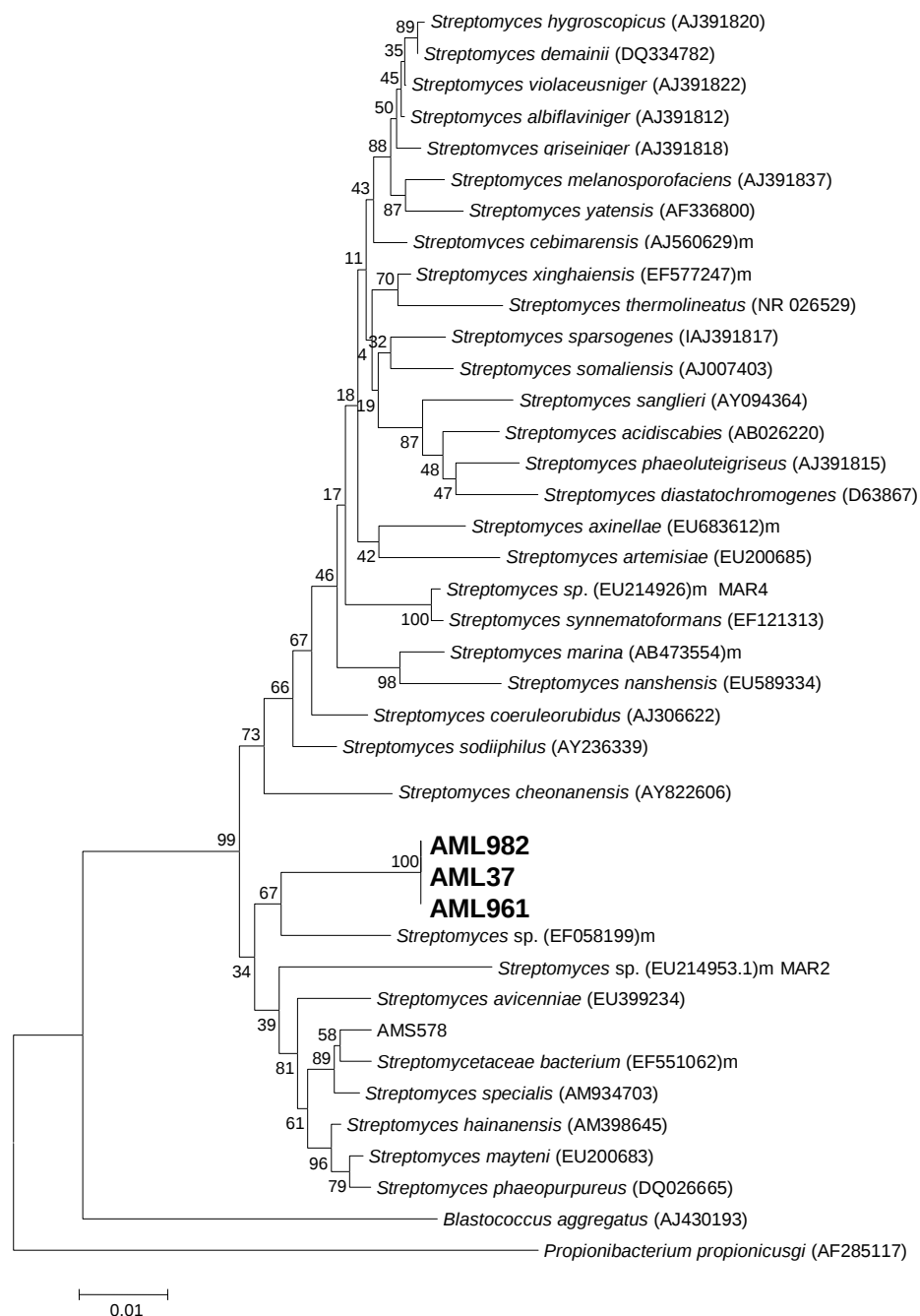


Figura 21. Árbol filogenético parcial del taxón nuevo de *Streptomyces* que requiere de agua de mar para crecer, en negritas se resalta las cepas que representan este nuevo taxón. El árbol se generó usando el método del vecino más cercano (Neighbor-Joining), con 1000 réplicas. Con un total de 1300 bases nucleotídicas del gen 16S ARNr. El nombre de la especie está seguido por el número de acceso del GenBank (de las secuencias representativas). m = cepas aisladas de ambiente marino.

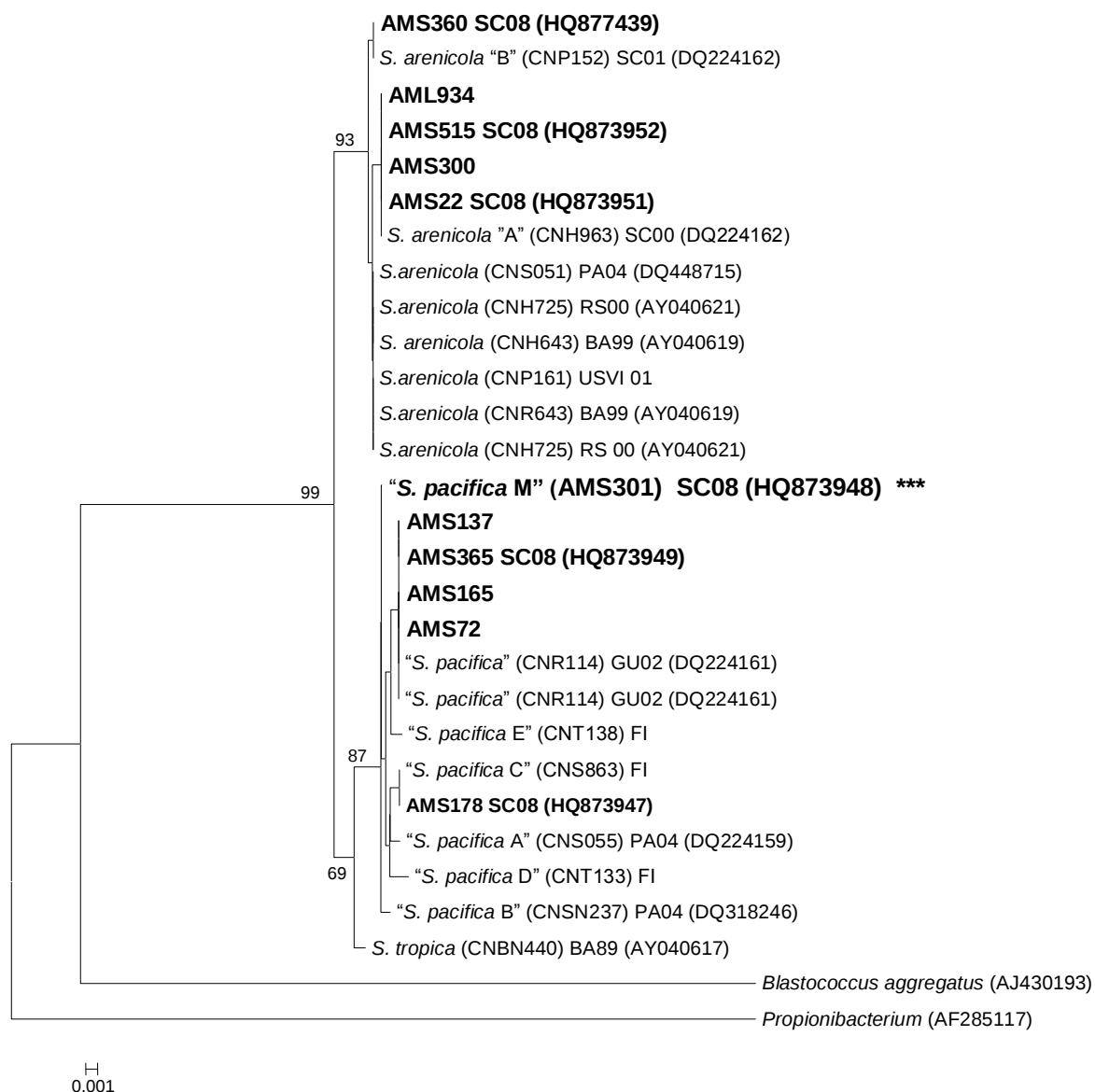


Figura 22. Árbol filogenético de los filotipos de *Salinispora*, empleando las dos especies formalmente descritas *S. arenicola* y *S. tropica* y la especie propuesta como "*S. pacifica*". El árbol se generó usando el método del vecino más cercano (Neighbor-Joining), con 1000 réplicas. Con un total de 1300 bases nucleotídicas del gen 16S ARNr. El nombre de la especie esta seguido por el numero de cepa, el lugar de aislamiento (BA, Bahamas; RS, Mar Rojo, Guam; PA, Palau; USVI, U.S. Islas Virginiás; SC, Mar de Cortés; FI, Fiji), año de colección (99 = 1999, etc.) y el número de acceso del GenBank (de las secuencias representativas). En negritas se encuentra las cepas aisladas en el presente trabajo. ***, taxón de "*S. pacifica M*" nuevo.

6.4. POTENCIAL BIOMEDICO DE LAS ACTINOBACTERIAS

6.4.1. Actividad antibiótica

A 302 extractos orgánicos de Actinobacterias se les probó su actividad antibiótica contra *Pseudomona aeuroginosa* y *Proteus vulgaris*. El 65.2 % de los extractos presentó actividad antibiótica contra uno o ambos patógenos, del total de las cepas bioactivas solo 19 cepas presentaron un halo de inhibición menor a 10 mm frente a las bacterias patógenas, el resto de las cepas bioactivas presentaron halos de inhibición entre 10-30 mm de diámetro.

Considerando las morfologías coloniales de las Actinobacterias y su requerimiento de agua de mar para crecer se observó que de 70 cepas de Actinobacterias con morfología colonial micelio sustrato que no requerían agua de mar para crecer pertenecientes al grupo I, el 12.8% presentaron actividad contra *P. aeuroginosa*, el 31.4% contra *P. vulgaris* y el 21.4% fueron activas contra ambos patógenos. Con respecto a 150 cepas de Actinobacterias con morfología colonial micelio sustrato que requerían agua de mar para crecer (Grupo II), el 14% presentó actividad únicamente contra *P. aeuroginosa*, el 22% presentó actividad únicamente contra *P. vulgaris* y el 26 % presentó actividad contra ambos patógenos. Por otra parte, las Actinobacterias con morfología colonial micelio aéreo bien desarrollado (Grupo III) (82 cepas), el 14.6% fueron activas contra *P. aeuroginosa*, el 39.0% contra *P. vulgaris* y el 17.0% presentó actividad contra ambos patógenos (Fig. 23).

Anteriormente se mencionó que las cepas del grupo I están relacionadas conforme al 16S ARNr a los géneros *Micromonospora*, *Nocardia*, *Verrucosipora* y *Nonomurea*, las del grupo II estaban relacionadas los géneros *Salinispora* y *Streptomyces*, las del grupo III se relacionaron a los géneros *Saccharomonospora*, *Actinomadura*, *Nocardiopsis* y *Streptomyces*. Cabe destacar que en todos los géneros se encontraron cepas con actividad antibiótica por ejemplo, las cepas AML46 y AML467 relacionadas al género *Streptomyces* ssp, la cepa AML24 (*Sacharomonospora* ssp), la cepa AML717 (*Nocardiopsis* ssp), la cepa AMS604 (*Verrucosipora* ssp), la cepa AML34 (*Actinomadura* ssp), las cepas AMS264 y AMS198 (*Micromonospora* ssp) y las cepas AMS548 y AMS462 (*Salinispora* ssp). Al considerar 27 UTO's formados empleando el gen 16S ARNr con una identidad de secuencia del 98%, se encontró que cinco UTOs presentaron actividad solo contra *P. aeuroginosa*, nueve UTO's fueron bioactivos únicamente contra *P. vulgaris* y ocho UTOs presentaron actividad contra ambos patógenos (Tabla IV).

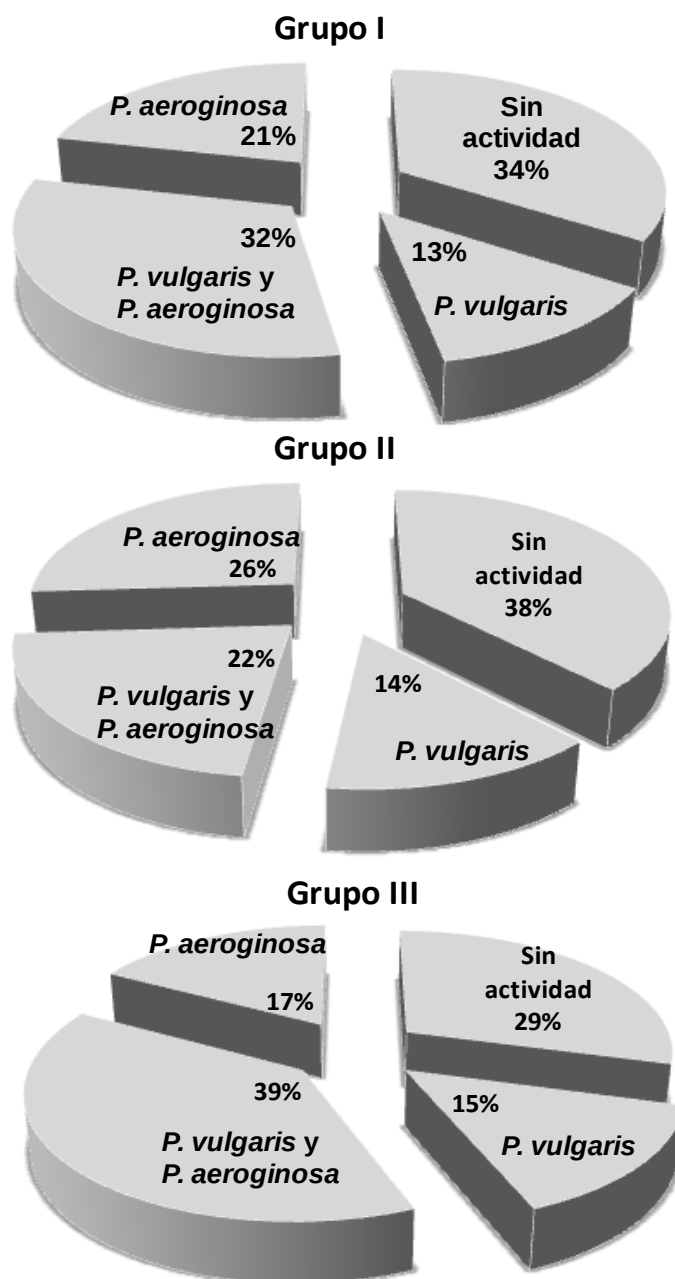


Figura 23. Porcentaje de actividad antibiótica de las Actinobacterias probadas contra los patógenos *Proteus vulgaris* y *Pseudomonas aeruginosa*. Grupo I= Actinobacterias con morfología colonial micelio sustrato y que no requieren de agua de mar para crecer, Grupo II= Actinobacterias con morfología colonial micelio sustrato y que requieren de agua de mar para crecer, Grupo III= Actinobacterias con morfología colonial hifas aéreas bien desarrolladas que no requieren de agua de mar para crecer.

Tabla IV. Bioactividad de Actinobacterias. Actividad antibiótica contra *P. vulgaris* y *P. aeruginosa* y actividad anticáncer contra la línea celular de cáncer de colon HCT-116. +presenta actividad; - no tiene actividad; ND, no determinado.

Familia	Género	# de UTO	Cepa	Bioactividad		
				<i>P. vulgaris</i>	<i>P. aeruginosa</i>	HCT-116
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Sacharomonospora</i>	1	AML899	+	-	ND
	<i>Sacharomonospora</i>	2	AML24	-	+	ND
	<i>Sacharomonospora</i>	3	AMS664	+	-	ND
<i>Nocardiaceae</i>	<i>Nocardiosis</i>	4	AML717	+	+	-
<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Nonomurea</i>	5	AMS362	ND	ND	+
<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Verrucosipora</i>	6	AMS180	ND	ND	ND
	<i>Verrucosipora</i>	7	AMS604	-	+	-
<i>Thermomonosporaceae</i>	<i>Actinomadura</i>	8	AML34	+	+	ND
<i>Thermomonosporaceae</i>	<i>Actinomadura</i>	9	AML286	ND	ND	ND
<i>Thermomonosporaceae</i>	<i>Actinomadura</i>	10	AML691	ND	ND	ND
<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i>	11	AML883	-	+	ND
	<i>Streptomyces</i>	12	AML961	-	-	-
	<i>Streptomyces</i>	13	AMS662	-	+	ND
	<i>Streptomyces</i>	14	AML960	+	+	-
	<i>Streptomyces</i>	15	AML852	+	+	ND
	<i>Streptomyces</i>	16	AML46	+	+	-
	<i>Streptomyces</i>	17	AML515	+	-	+
	<i>Streptomyces</i>	18	AML467	+	+	-
	<i>Streptomyces</i>	19	AML732	+	-	ND
	<i>Streptomyces</i>	20	AML581	+	-	+
	<i>Streptomyces</i>	21	AMS598	+	-	-
	<i>Streptomyces</i>	22	AMS578	+	+	ND
	<i>Streptomyces</i>	23	AMS581	+	+	ND
<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Micromonospora</i>	24	AMS264	+	-	ND
<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Micromonospora</i>	25	AMS30	-	+	-
<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Salinispora</i>	26	AMS444	+	-	+
<i>Nocardiaceae</i>	<i>Nocardia</i>	27	AMT22	+	+	-

6.4.2. Actividad Anticáncer

Se seleccionaron 64 cepas pertenecientes del grupo I, 84 cepas del grupo II y 27 cepas del grupo III, para obtener un total de 175 extracto orgánicos de Actinobacterias, a los cuales se les probó su actividad anticáncer contra la línea celular de carcinoma colorrectal HCT-116, de pulmón H460 y de mama HeLa. El 35% de los extractos orgánicos presentó actividad anticáncer, 27 extractos presentaron actividad contra la línea celular HCT-116, 10 contra la línea celular HeLa, 5 contra la línea celular H460, 14 presentaron actividad contra dos de las líneas celulares y solo una presentó actividad contra las tres líneas celulares.

De los 63 extractos bioactivos 13 extractos pertenecían al grupo I, 42 al grupo II y 7 extractos pertenecían al grupo III. Según el 16S ARNr las cepas bioactivas pertenecientes al grupo I se relacionaron a los géneros *Micromonospora* ssp. (12 cepas) y *Nonoromureae* (una cepa), las del grupo II al género *Salinispora* (42 cepas), y las del grupo III al género *Streptomyces* (7 cepas).

Cabe destacar que en todas las localidades encontramos cepas con actividad anticancerígena y o antibiótica; sin embargo, es interesante ver como Actinobacterias de las mismas localidades y con las mismas morfologías coloniales y por ende se espera sean del mismo género presentan o no presentan actividad. Por ejemplo, las Actinobacterias del grupo II están relacionadas al género *Salinispora* ssp (según el 16S ARNr), de 95 cepas con morfología colonial propias del género *Salinispora* aisladas de la localidad de la Bahía de Loreto en la zona B, el 12.6% presentó actividad antibiótica contra *P.*

aeruginosa, el 24.2 % contra *P. vulgaris* y el 25.2% contra ambos patógenos. En la zona A de Bahía de Loreto de 25 cepas de *Salinispora* el 14% presentó actividad antibiótica contra *P. aeruginosa*, el 22 % contra *P. vulgaris* y el 26% contra ambos patógenos. Esto hace pensar porqué si las cepas no tienen diferencias filogenéticas entre ellas, están produciendo o no compuestos bioactivos. Una posible explicación es que el gen que codifica para la biosíntesis del metabolito secundario se adquirió recientemente por TGH y por ende no todas las cepas lo presentan debido a que no fue un ancestro en común de *Salinispora* que dejó la información para la biosíntesis sino que es la TGH la responsable, o es una selección débil para la biosíntesis, o puede ser que los metabolitos secundarios que están produciendo tengan la función ecológica y solo en presencia de otra bacteria las Actinobacterias biosinteticen los compuestos como una forma de defensa. Cabe destacar que las condiciones de cultivo empleadas fueron las mismas para todas las cepas, sin embargo, no en todas las cepas se pudieron activar los genes responsables de la biosíntesis de los metabolitos secundarios bajo las mismas condiciones de cultivo.

Al considerar por separado la bioactividad de cepas relacionadas al género *Salinispora* y en otro grupo el resto de las Actinobacterias, se encontró que las cepas relacionadas a los géneros *Streptomyces* ssp, *Micromonospora* ssp., *Nonoromureae* ssp y *Nocardia* ssp, presentaron un 22% de actividad anticáncer. Lo anterior está de acuerdo con trabajos en donde no se aíslan Actinobacterias del género *Salinispora* como lo reportan Hong et al. (2009)

quienes encontraron que el 20% de los actinomicetos aislados de diferentes ambientes marinos presentaron actividad contra células de cáncer de colon (HCT116). De manera similar, El-Shatoury et al. (2009) encontraron que el 17.5% de los actinomicetos aislados de ambientes marinos presentaron actividad antitumoral. Por otra parte, de las cepas relacionadas al género *Salinispora* ssp. el 50% presentó actividad anticáncer, y el 62% presentó actividad antibacteriana, esto es diferente a lo encontrado por Fenical y Jensen (2006) que mencionan que de 100 cepas de *Salinispora* el 80 % presentó actividad anticáncer y el 35 % actividad antibiótica. Cabe destacar que las especies de *Salinispora* encontradas en el Golfo de California son diferentes a las encontradas en otras localidades del mundo (Fenical y Jensen 2006), como se mencionó anteriormente en el Golfo de California habitan *S. arenicola* secuencias tipo 'A' y 'B' y "*S. pacifica*" secuencias tipo 'C', 'M' y estándar. Podemos asumir que estas Actinobacterias tienen la capacidad para producir un arsenal de sustancias bioactivas conocidas y nuevas.

6.4.3. Metabolitos secundarios bioactivos

El análisis químico de los metabolitos secundarios bioactivos se realizó en cuatro cepas de Actinobacterias. Considerando la bioactividad que presentaron las Actinobacterias del género *Salinispora* y su importancia como género nuevo de origen marino capaz de biosintetizar compuestos nuevos bioactivos. El extracto crudo de las cepas AMS22, AMS515 y AMS300, aisladas de la Bahía

de Loreto a 200 m de profundidad se analizaron por espectroscopía de masas. Así mismo, teniendo en cuenta que el género *Streptomyces* es el más estudiado desde hace 60 años y que destaca por producir más de 7,600 compuestos incluyendo fármacos antitumorales y antibióticos (Bérdy 2005) se analizó la cepa AMT11, aislada de la Bahía de Todos Santos a 20 m de profundidad.

Las cepas AMS22, AMS515 y AMS300 según el 16S ARNr pertenecen a la especie *S. arenicola* secuencia tipo 'A', presentaron actividad contra células de cáncer colorrectal HCT-116 y antibiótica contra los patógenos *P. vulgaris* y *P. aeuroginosa*. El análisis por espectroscopía de masas de los extractos crudos confirmó la presencia del antibiótico rifamicina P con un ion molecular de m/z $[M]^+$ 737.27 y una longitud de onda de máxima absorción ($\lambda_{\max}$) de 220, 300, 420 nm (Fig. 24), la presencia de este compuesto fue evidente en las tres cepas. Este resultado concuerda con Penn y colaboradores (2009), quienes identificaron en el genoma de la especie *S. arenicola* los genes involucrados en la biosíntesis de rifamicina y derivados de este, cabe destacar que estos antibióticos actúan contra bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, etc. Las cepas patógenas *P. vulgaris* y *P. aeuroginosa* utilizadas en este estudio son bacterias Gram negativas y son resistentes a rifamicina esto indica que las cepas de *S. arenicola* secuencia tipo 'A' están produciendo al menos un metabolito secundario diferente a la rifamicina y que es capaz de inhibir el crecimiento de estos patógenos. En cuanto a la actividad anticáncer, se sabe que la especie *S. arenicola* es

productora de compuestos citotóxicos como arenicolidas A-C (Phillip et al. 2007), estaurosporina, arenimycin cuya actividad se ha probado con la línea celular de cáncer de colon HCT-116 (Asolkar et al. 2010). En el espectro de masas de los extractos crudos de las cepas AMS22, AMS515 y AMS300 se observaron señales cuyas longitudes de onda e iones moleculares no coinciden con los compuestos ya reportados lo que sugiere que estas bacterias están produciendo compuestos nuevos con aplicaciones biotecnológicas.

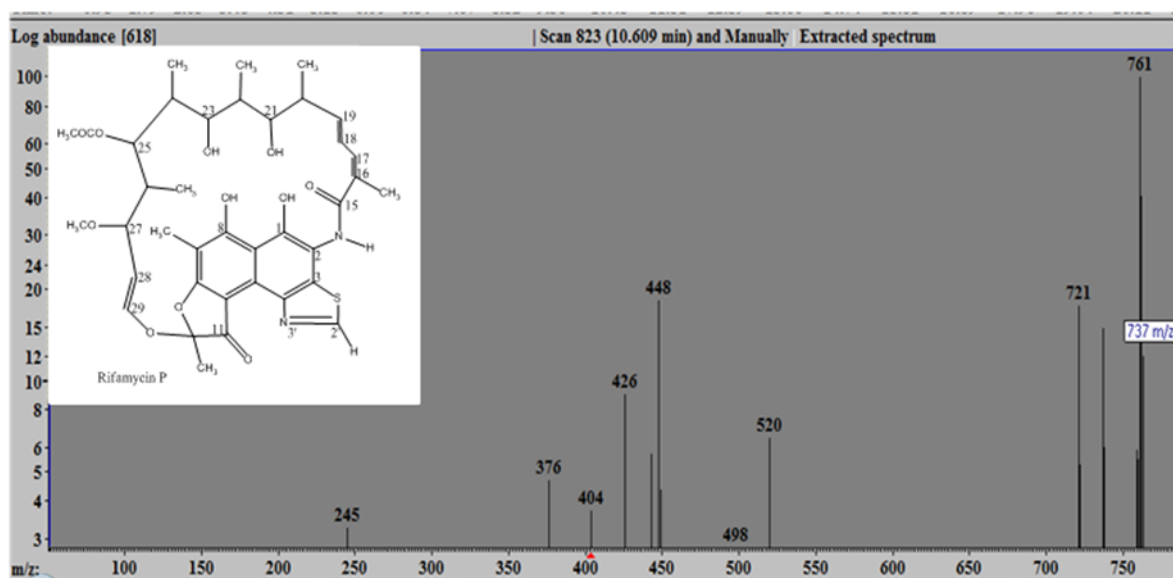


Figura 24. Estructura de rifamicina P y su espectro de masas.

Por otra parte, la cepa AMT11 identificada según el 16S ARNr como *Streptomyces werraensis* con un 100% de similitud de secuencia, presentó una actividad muy potente contra células de carcinoma colon (HCT-116, un $IC_{50} > 0.7 \mu g mL^{-1}$); con la finalidad de encontrar los compuestos responsables de dicha actividad, se obtuvo el extracto orgánico del cultivo de 8 litros de esta

cepa. El extracto crudo se fraccionó por cromatografía en columna fase reversa C-18 y posteriormente las fracciones se purificaron por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés). El análisis de las fracciones por espectroscopía de masas confirmó la presencia de monactin ($C_{41}H_{66}O_{12}$) con un ion molecular de m/z $[M]^+$ 750 y una longitud de onda de máxima absorción (λ_{max}) a 260 nm, compuesto conocido como un macrotetrólido de la familia de los nonactines. Los compuestos de la familia de los nonactines tienen actividad antibiótica y antitumoral contra diferentes líneas celulares y han sido aislados de diferentes *Streptomyces* de origen terrestre, y marino (Bennett et al. 1962; Jeong et al. 2006). Otro compuesto identificado fue panamycin-607 (PM-607), con una absorbancia máxima en el UV (λ_{max}) de 240 nm y un ion molecular de m/z $[M]^+$ 607. Asimismo se encontró un fragmento a m/z 213 que corresponde a la fracción diol de la molécula y que es considerado como una estructura firma en su patrón de fragmentación (Fig. 25) (Natsume et al. 1995; Makoto et al. 2005), confirmando la presencia de PM-607, caracterizado por ser un macrólido de anillo de 16 miembros con un grupo dimetilamino en la cadena lateral y presenta actividad antibiótica. Así mismo, se detectaron los iones moleculares m/z $[M]^+$ 649, 692 y 678 relacionados a compuestos derivados de PM-607 y aislados anteriormente a partir de *S. albongier* (Natsume et al. 1995). El monactin y PM-607 se han aislado de diferentes especies de *Streptomyces*, por lo que no es de sorprender que la cepa AMT11 esté produciendo ambos compuestos, pues estructuralmente ambos macrólidos están relacionados (Fig. 26).

Figura 25. Estructura química de monactin, y derivados de panamicin.

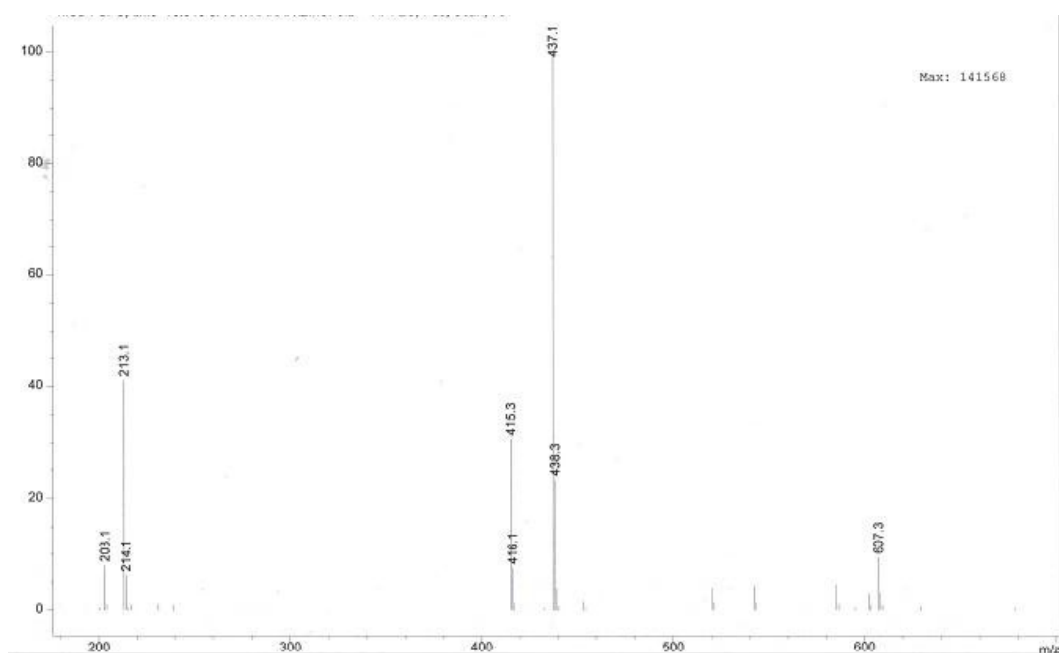


Figura 26. Espectro de masas del compuesto panamicin 607.

Se pudo identificar muchas cepas de Actinobacterias marinas como una fuente de productos naturales con actividad antitumoral y antibiótica muy promisoría. Sin embargo, ¿cómo seleccionar entre todas las cepas de Actinobacterias bioactivas, la cepa que es capaz de producir compuestos nuevos? En las cepas con similitudes de secuencias del gen 16S ARNr a otras conocidas en ambientes de origen terrestre hay menos probabilidades de encontrar nuevos compuestos, pues han sido estudiadas ampliamente por varios años, como por ejemplo la cepa AMT11 cuyo porcentaje de similitud es del 100% a *Streptomyces werraensis* (conocido en el ambiente terrestre) se identificaron cinco compuestos conocidos. Sin embargo, en las Actinobacterias de origen marino cuyos porcentajes de similitud es diferente a lo reportado en el NCBI, hay mayor probabilidad de encontrar compuestos nuevos. Por ejemplo en las cepas AMS22, AMS300 y AMS515 relacionadas a *S. arenicola* filotipo 'A' solo se detectó por espectroscopía de masas un compuesto conocido y varios iones moleculares que no se pueden relacionar a compuestos ya conocidos. El uso de herramientas moleculares es indispensable primero para identificar especies nuevas y posteriormente poder seleccionar entre varias cepas de una misma especie las productoras de compuestos nuevos.

6.5. Genes biosintéticos de metabolitos secundarios

En el Golfo de California hay una gran diversidad de Actinobacterias marinas capaces de producir compuestos con actividad antibiótica y anti-cáncer, sin embargo, para predecir cuál de estas cepas produce compuestos nuevos aun dentro de una misma especie, es necesario hacer uso de herramientas moleculares para identificar la presencia de sistemas PKS involucrados en los módulos biosintéticos de metabolitos secundarios. En este estudio se encontró que las cepas relacionadas al género *Salinispora* resaltaron por su abundancia, diversidad y bioactividad, por tal motivo, a tres cepas de *S. arenicola* y dos cepas de “*S. pacifica*” se les evaluaron su capacidad biosintética del metabolismo secundario buscando secuencias KS por PCR. La librería de secuencias KS se realizó con 10 a 41 clonas con insertos positivos y se obtuvieron de uno a cuatro clonas únicas por cada cepa.

En la especie *S. arenicola* (cepas AMS22, AMS300 y AMS515) se detectaron nueve secuencias de KS, mientras que en “*S. pacifica*” (cepas AMS301 y AMS178) se identificaron cinco secuencias KS. Basados en los análisis de BLAST y filogenético, la mayoría de las secuencias de KS (73%) fueron asociadas con PKS y el resto (27%) a rutas biosintéticas de enediino.

En “*S. pacifica*” secuencia tipo ‘M’, cepa AMS301, una de las secuencias KS presentó un 95-98% de similitud a las secuencias asociadas con el módulo del gen biosintético de limfostin, el cual ha sido reportado en *S. arenicola* y *S.*

tropica (Penn et al. 2009) compuesto que ha sido aislado también de *Streptomyces* (Nagata et al. 1997). Las otras tres secuencias de KS se relacionaron con un 85% de similitud $\leq$ a la secuencia KS de “*S. pacifica*” secuencia tipo “B” (cepa CNS-237, No. de acceso ACZ54323), y un 55% de similitud a curacin *Curl* obtenido de *Lyngbya majuscula* (Chang et al. 2004). En “*S. pacifica*” secuencia tipo ‘C’, cepa AMS178, solo se detectó un módulo de KS con un 55% de similitud a los genes de la ruta biosintética de nostopeptólido (*NosB*) producido por *Nostoc* sp. (Hoffmann et al. 2003) (Fig. 27).

Cinco secuencias KS se detectaron en *S. arenicola* secuencia tipo ‘A’ cepas AMS515 y AMS22 relacionadas con un 88% de similitud a la secuencia de amino ácidos de los genes *rifA* y *rifE*, estos genes están involucrados en la ruta biosintética de rifamicina producida por *Amiclatopsis mediterranei* (August et al. 1998).

En las cepas AMS300 y AMS22 se detectaron dos dominios KS relacionadas a las rutas de biosíntesis de enediino. Un clado presentó un 89% de similitud a la ruta biosintética del compuesto enediino de 10 miembros, calicheamicina (*Cal05*) producido por *M. echinospora* (Joachim et al. 2002) y otro clúster tuvo 84% de similitud a neocarzinostatina (*NcsE*) compuesto enediino de 9 miembros producido por *S. carzinostaticus* (Liu et al. 2005).

Todas las secuencias KS detectadas en *S. arenicola* secuencia tipo ‘A’ (cepas AMS515, AMS22 y AMS300) presentaron una identidad de secuencia del 97% a 100% a las encontradas en el genoma de *S. arenicola* (cepa CNS-205 secuencia tipo estándar) (Penn et al. 2009).

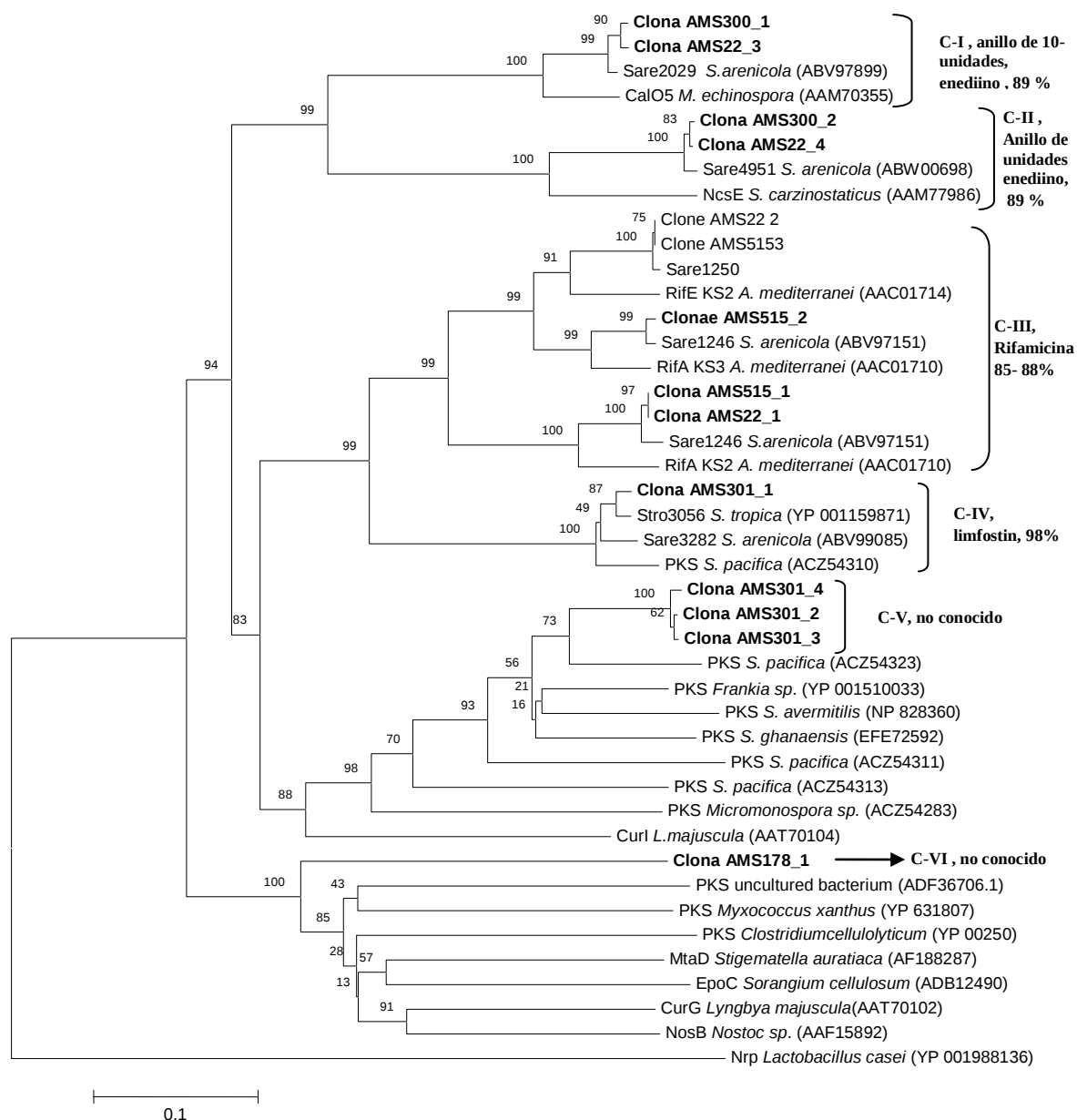


Figura 27. Árbol filogenético de las secuencias cetosintetasa KS encontradas en cepas del género *Salinispora*. El árbol fue construido usando el modelo del vecino más cercano (Neighbor-Joining); las alineaciones de los dominios KS se realizaron con secuencias de 86 amino ácidos, para las clonas PKS de las cepas AMS22, AMS300, AMS515, AMS301 y AMS178.

Es importante resaltar que todas las secuencias KS presentaron un sitio activo de cisteína con una secuencia conservada VDTACSSSLVA en los dominios KS (Aparicio et al., 1996; Bevitt et al., 1992; Donadio y Katz, 1992) y un residuo de histidina conservado a 135 nucleótidos del centro activo del dominio de KS, en dirección al extremo C-terminal. Particularmente en los genes KS en donde el porcentaje de similitud fue menor a 55% a las secuencias KS de rutas metabólicas conocidas se observaron variaciones dentro de la secuencia conservada, por ejemplo en el cluster C-V (clonas AMS301,2,3,4) la valina que se encuentra en el quinto lugar después del sitio activo de cisteína, fue remplazada por una alanina. Así mismo, la única clona que se encontró en la cepa AMS178 presentó mayor variación dentro de la secuencia conservada, esto fue una glutamina en el lugar tercer en el N-terminal, una treonina en el lugar segundo después del C-terminal (Fig. 28). Con las variaciones en la secuencia conservada de los genes KS obtenidos en las cepas AMS301 y AMS178 podemos predecir que estas cepas tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios nuevos; aunque cabe la posibilidad de que presenten o no presenten alguna bioactividad con interés farmacológico.

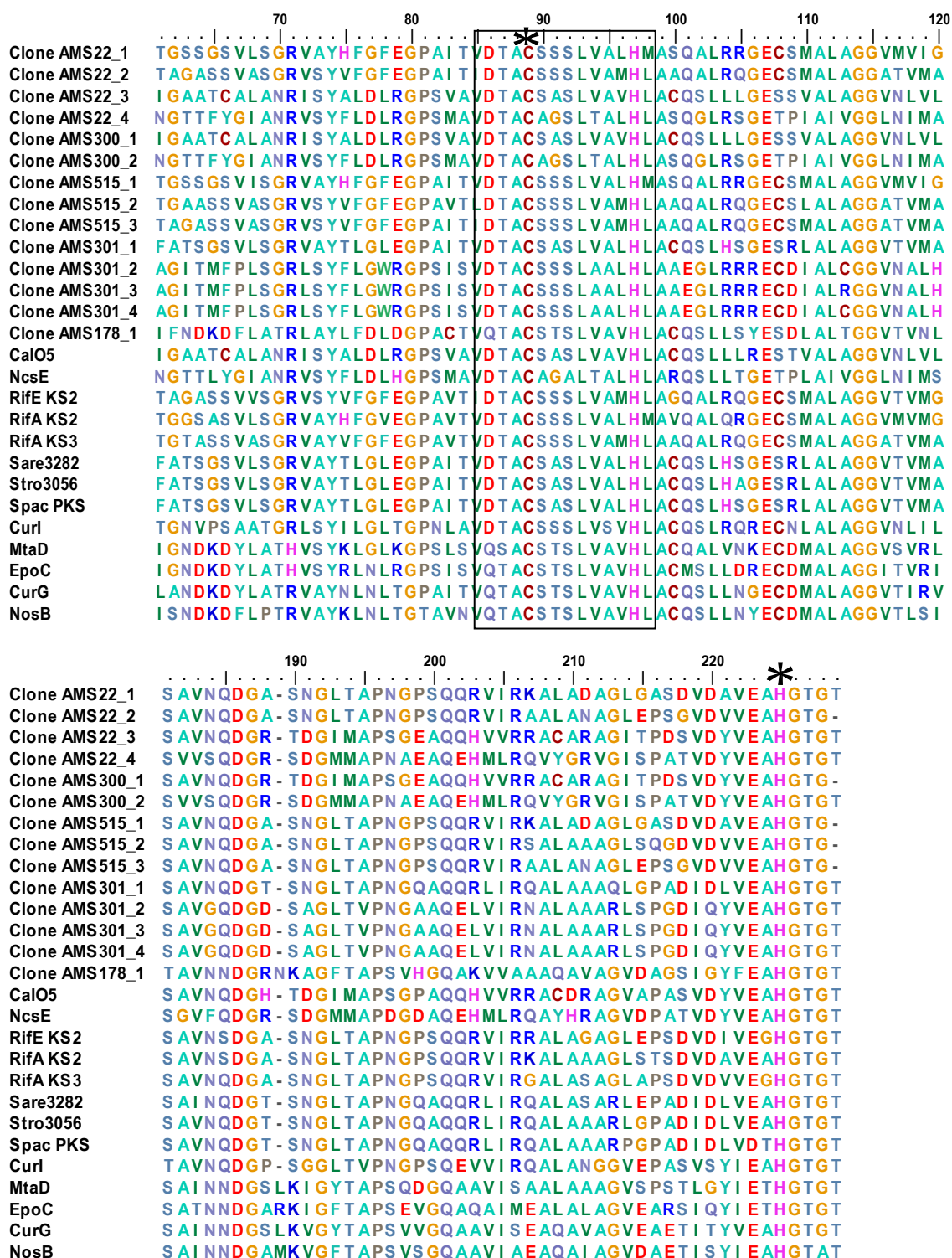


Figura 28. Secuencia de amino ácidos de las secuencias KS encontradas en cepas del género *Salinispora*. El asterisco indica el sitio activo de cisteína y histidina, la secuencia conservada está encerrada en un cuadro.

Las secuencias de KS con porcentajes de similitud <85% a módulos de rutas metabólicas caracterizadas, indican que las cepas tienen la capacidad de biosintetizar compuestos diferentes a las rutas biosintéticas caracterizadas. Tal es el caso de "*S. pacifica*" secuencias tipo 'C' y 'M' (cepas AMS178 y AMS301, respectivamente) las cuales presentaron secuencias KS con un 55% de similitud a los genes involucrados en la biosíntesis de curarin y nostopeptolido. Por otra parte, los porcentajes de similitud ≥85% relacionados a las rutas metabólicas caracterizadas para los compuestos rifamicina, calicheamicina y limfostin, indican que las cepas tienen la capacidad de biosintetizar estos compuestos o derivados de los mismos. Para corroborar la producción de estos compuestos las cepas AMS515, AMS300 y AMS22 se cultivaron en medio líquido A1 y se monitoreó la producción de estos compuestos por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (Liquid chromatography-tandem mass spectrometry) (LC/MS/MS). A partir del día 7 el ion molecular $[M]^+$ de rifamicina se detectó en los extractos crudos obtenidos con acetato de etilo. La longitud de onda de máxima absorción ($\lambda_{\max}$) a 220, 300, 420 nm y el ion molecular de m/z $[M]^+$ 737.27 confirmaron la presencia de rifamicina P con fórmula molecular $C_{38}H_{46}N_2O_{11}S$.

En las cepas AMS300 y AMS22 se detectaron las secuencias KS relacionadas a las rutas metabólicas de los antibióticos calicheamicina y neocarzinostatina relacionados a las familias de enediinos, sin embargo, bajo las condiciones de cultivo empleadas no fue posible detectar la producción de ninguno de estos compuestos o estructuras químicas relacionadas a estos compuestos.

Recientemente se reportó la elucidación de los compuestos cianosporasides y esporolides asilados de "*S. pacifica*" y *S. tropica* respectivamente, se cree que estos compuestos fueron sintetizados a partir de la ruta metabólica PKS de enediino, la hipótesis es que una vez biosintetizado el compuesto enediino, este sufre una reacción de ciclación espontánea del tipo Bregman, en donde el diradical intermediario es estabilizado por halógenos (Buchanan et al. 2005; Oh et al. 2006) (Fig. 29).

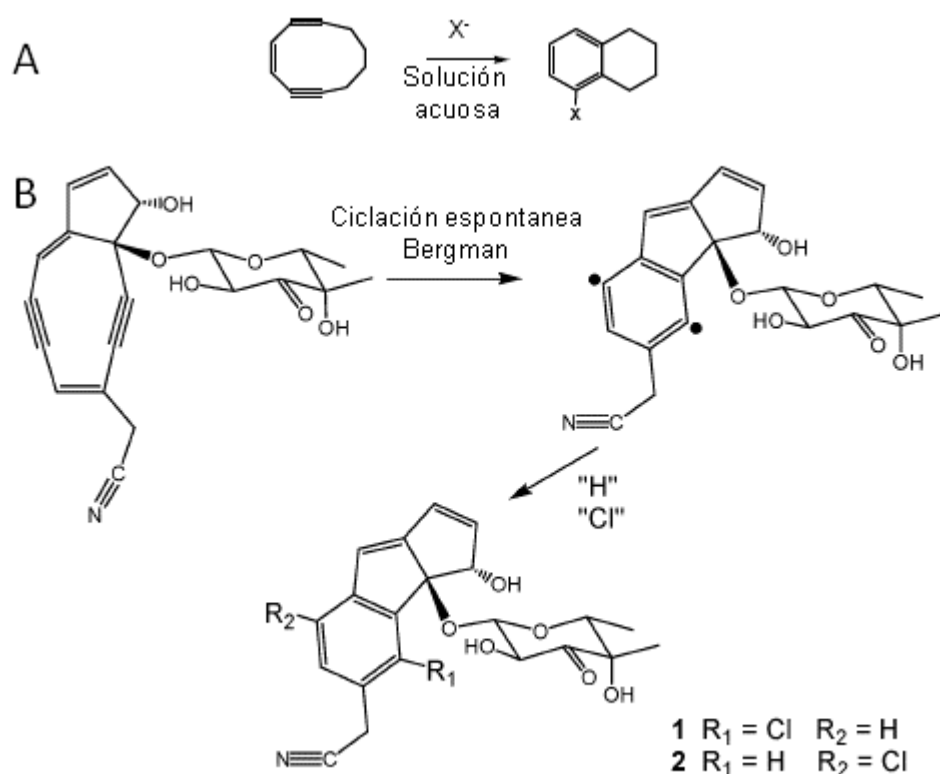


Figura 29. Mecanismo de ciclación del compuesto enediino. A) reacción general de ciclación de Bergman (Modificado de Perrin et al. 2007). B) Mecanismo de ciclación propuesto para los compuestos cianosporasides A y B asilados de "*S. pacifica*" (modificado de Oh et al. 2006)

La presencia de secuencias KS responsables de la biosíntesis de linfostin no se pudo correlacionar con su producción, ya que no se detectó por espectroscopía de masas el ion molecular relacionado a linfostin, esto no significa que las cepas no puedan biosintetizar el compuesto. Hay que considerar que las cepas solo se cultivaron bajo una misma condición de fermentación en medio de cultivo A1, puede ser que estas condiciones de cultivo no sean las adecuadas para que la cepa produzca los compuestos, o que el gen no se encuentre activo. Otra posibilidad es que la cepa solo produzca este tipo de metabolitos secundarios como un mecanismo de defensa contra otro microorganismo.

En este estudio se encontró un porcentaje de similitud (84%- 89%) (Tabla V) entre las secuencias KS encontradas en *S. arenicola* con *M. echinospora* perteneciente a la misma familia (*Micromonosporaceae*) y también como *S. carsinostaticus* y *A. mediterranei* pertenecientes a las familias *Streptomycetaceae* y *Pseudonocardia* respectivamente; esto indica que existe un intercambio de genes entre Actinobacterias, conocido como transferencia de genes horizontal (TGH), que permite a las células adquirir nuevos genes (Jensen et al. 2007). Debido a la TGH es muy probable encontrar cepas aun dentro de la misma especie que sean productoras de diferentes compuestos.

Tabla V. Porcentaje de similitud de las secuencias KS encontrados con rutas biosintéticas reportadas en el NCBI.

Cepa		Clona	Gen (microorganismo)	Compuesto	% de identidad
S. arenicola	AMS22	1	rifA KS2 (<i>Amiclatopsis mediterranei</i>)	Rifamicina	88%
		2	rifE KS2 (<i>Amiclatopsis mediterranei</i>)	Rifamicina	85%
		3	Cal05 (<i>Micromonospora echinospora</i>)	Calicheamicina	89.3%
		4	NcsE (<i>Streptomyces carzinostaticus</i>)	Neocarzinostatina	83.9%
	AMS300	1	Cal05 (<i>Micromonospora echinospora</i>)	Calicheamicina	89.6%
		2	NcsE (<i>Streptomyces carzinostaticus</i>)	Neocarzinostatina	83.9%
	AMS515	1	rifA KS2 (<i>Amiclatopsis mediterranei</i>)	Rifamicina	88%
		-	rifA KS3 (<i>Amiclatopsis mediterranei</i>)	Rifamicina	88%
		-	rifE KS2 (<i>Amiclatopsis mediterranei</i>)	Rifamicina	85%
S. pacifica	AMS301	1	Strop3056 1 (<i>Salinispora tropica</i>)	Lymfostin	98%
		2	CurI (<i>Lungya majuscula</i>)	Curacin	55%
		3	CurI (<i>Lungya majuscula</i>)	Curacin	55%
		4	CurI (<i>Lungya majuscula</i>)	Curacin	55%
	AMS178	1	NosB (<i>Nostoc</i> sp.)	Nostopeptolido	55 %

Cabe destacar que en el genoma de *S. arenicola* se han identificado 30 clusters relacionados a genes biosintéticos de metabolitos secundarios (Penn et al 2009). Sin embargo, los cebadores degenerados empleados en este estudio solo amplificaron las secuencias KS relacionadas a cuatro clusters biosintéticos de los compuestos rifamicin, lymfostin, anillos enediino de nueve y diez miembros. Pero se detectaron secuencias KS relacionadas a la biosíntesis de metabolitos secundarios no conocidos, como las encontradas en “*S. pacifica*” cepas AMS301 y AMS178. Se podrían usar primers no-degenerados para identificar de forma individual las rutas metabólicas de genes biosintéticos de metabolitos secundarios ya conocidos en el genoma, pero no se detectarían los no conocidos presentes en aislados de Actinobacterias nuevas.

La ventaja de usar primer degenerados, es que provee una aproximación en la clonación y detección de módulos de genes PKS conocidos y no conocidos presentes en asilados puros en varios microorganismos. Actualmente, el uso en la detección de módulos de genes PKS por una población natural de actinomicetos usando primers específicos y /o degenerado por PCR se ha incrementado; y entre más estudios se realicen se van a perfeccionar los primer y las técnicas para determinar mayor cantidad de genes biosintéticos de metabolitos secundarios que se encuentren presentes en el genoma de un microorganismo sin la necesidad de secuenciar todo el genoma.

Las técnicas moleculares proveen un criterio de selección de cepas con capacidad metabólica de biosintetizar metabolitos secundarios nuevos; lo que permite que en futuras investigaciones se realicen diferentes pruebas en las condiciones de fermentación para que los aislados expresen o activen su maquinaria biosintética para la síntesis de determinado metabolito secundario; Así mismo, dirige la búsqueda y elucidación de estructuras químicas relacionadas a la ruta metabólica del metabolito secundario identificado.

7. DISCUSIÓN GENERAL

Las Actinobacterias marinas son una fuente de nuevos metabolitos secundarios, como antibióticos, anticáncer, antiinflamatorios, antifúngicos, entre otros (Fenical y Jensen 2006; Olano et al. 2009). Sin embargo, su ecología, su diversidad taxonómica y metabólica no han sido del todo investigadas. Esto hace necesario aislar, caracterizar y buscar géneros y especies nuevas de Actinobacterias marinas para entender su posible nivel ecológico y su potencial biotecnológico.

El sedimento marino del Golfo de California y de Bahía de Todos Santos contiene una diversidad de Actinobacterias cultivables y según el 16S ARNr las Actinobacterias se agrupan en 55 unidades taxonómicas operacionales (UTOs) con un porcentaje de similitud de secuencia de 100 %, 37 UTOs a un 99 % de similitud y 27 UTOs a un 98 %. Para cada porcentaje de similitud, se encontraron UTOs nuevos; 44 UTOs nuevos al 100% de identidad, 9 al 99% y 3 al 98% y otros más relacionados a bacterias de origen marino, 7 UTOs al 100%, 11 al 99% y 9 al 98% de similitud de secuencia.

Dentro de las especies de origen marino que han sido descritas formalmente se encontraron las cepas AML899 con un 99.5% de similitud a *Saccharomonospora marina* (Liu et. al. 2010), la cepa AMS264 con 99.08% de similitud a *Micromonospora Krabiensis* (Jongrungruangchok et al. 2008) y AMS300 y AMS360 con un 99.9% de similitud a *S. arenicola* (Maldonado et al.

2005). Cabe destacar que en zonas tropicales y subtropicales en diferentes partes del mundo se ha aislado *S. arenicola* sin presentar variaciones en el 16S, sin embargo, únicamente en el Golfo de California habita *S. arenicola* filotipos 'A' y 'B' las cuales solo tienen un nucleótido de diferencia en el 16S ARNr respecto a *S. arenicola* secuencia estándar.

Existe una gran cantidad de Actinobacterias de origen marino que no han sido descritas formalmente y que están relacionadas taxonómicamente con las aisladas en el Golfo de California. Por ejemplo: la especie propuesta como "*S. pacifica*" es la primera vez que se aísla en el Golfo de California encontrando tres UTOs, "*S. pacifica*" secuencia tipo 'C' (cepa AMS178, HQ873947), "*S. pacifica*" secuencia estándar (cepa AMS365, HQ873949) y una sin precedentes clasificada como "*S. pacifica*" secuencia tipo 'M' (cepa AMS301, HQ873948); esto resalta la importancia de la descripción formal de diferentes Actinobacterias marinas nuevas. Como por ejemplo, el taxón nuevo encontrado en el Golfo de California que requiere agua de mar para crecer con una morfología colonial con micelio sustrato de color blanco, relacionado con un 95.5% de similitud del gen 16S ARNr a diferentes especies del género *Streptomyces* de origen marino como *S. artemesia* (Zhao et al. 2010), *S. sodiiphilus* (Li et al. 2005), *S. synnematoformans* (Hozzein y Goodfellow 2007), *S. nanshensis* (Tian et al. 2009c), *S. armeniacus* (NR_036815) y otras Actinobacterias de origen marino como *Streptomyces* sp. CNH990 (EF058199), CNS-730 designada como MAR2 y CNQ-181 (EU214926) nombrada como MAR4 (Prieto-Davo et al. 2008).

Respecto al aislamiento de las actinobacterias, no existe un medio de cultivo en donde se aíslen todos los géneros de Actinobacterias, de hecho se menciona que menos del 1% de las bacterias que se encuentran en el océano se pueden cultivar, los medios de cultivo empleados no funcionaron igual en todas las localidades, por lo que el uso de técnicas moleculares independientes del cultivo como por ejemplo metagenómica nos permitiría tener un panorama de la diversidad de Actinobacterias que se encuentran habitando en el sedimento marino. Sin embargo en este estudio se consideró la parte cultivable, mientras más se conozca de las Actinobacterias marinas su fisiología, metabolismo, etc. se podrán optimizar las técnicas para su aislamiento.

No está a discusión la capacidad de las Actinobacterias para producir metabolitos secundarios bioactivos, en el presente trabajo se encontraron Actinobacterias bioactivas en diferentes localidades desde 0 hasta 300m de profundidad y todos los géneros fueron capaces de biosintetizar metabolitos secundario bioactivos, lo importante es poder seleccionar las cepas que son capaces de producir compuestos nuevos de una manera rápida y efectiva, de esta manera se optimizan recursos humanos y económicos.

Particularmente el género *Salinispora* tiene un gen 16S muy conservado con pequeñas variaciones de 5 o 15 nucleótidos entre las tres especies (*S. arenicola*, "*S. pacifica*" y *S. tropica*), lo que representa una variación menor o igual a 1% entre estas especies (Jensen 2010); Sin embargo, los módulos KS involucrados en la síntesis de compuestos, presentan mayor variación aun dentro de la misma especie. Específicamente, el árbol filogenético basado en

secuencias KS de las cepas *S. arenicola* del presente trabajo presentaron un 97-100% de similitud a las secuencias del genoma reportado de *S. arenicola* cepa (CNS-205) esto indica una rápida evolución de los genes PKS, que no se aprecia en un gen tan conservado como es el 16S ARNr en donde tienen un nucleótido diferente. Esto mismo ocurre con las cepas "*S. pacifica*" aisladas en este trabajo, las cuales tienen una diversidad intra-específica en el 16S ARNr de un 99.77% de similitud entre ellas. En el análisis filogenético de las secuencias de KS de las cepas AMS301 y AMS178 se observan mayor diferencia. Comparando las secuencias KS obtenidas en este estudio con las que se encuentran en los genomas de *S. arenicola* y *S. tropica* y lo reportado anteriormente (Gotang *et al.* 2010, Penn *et al.* 2009, Uduary *et al.* 2007), se encontró que la secuencia de KS de la clona AMS301,1 presenta mayor similitud (98%) a *S. tropica* (gen Strop_3056.) y menor similitud (95%) a *S. arenicola* (gen Sare_3282) y "*S. pacifica*" (cepa CNS-055 PL04, gen KS). Se puede asumir que taxones diferentes de una misma especie pueden producir diferentes juegos de derivados policétidos de metabolitos secundarios nuevos. Las cepas de *Salinispora* aisladas en este trabajo presentaron actividad anticáncer y antibiótica, lo cual sugieren que estas cepas pueden estar produciendo policétidos nuevos bioactivos.

Los taxones nuevos encontrados en el Golfo de California resaltan el hecho de la gran diversidad de Actinobacterias que residen en el sedimento marino. El análisis del gen 16S del ARNr es un primer patrón que servirá de base para

buscar nuevos taxones de Actinobacterias, con amplias posibilidades de que produzcan nuevos metabolitos de interés biotecnológico.

Las herramientas moleculares son de gran utilidad para determinar rutas biosintéticas de metabolitos secundarios; en este trabajo, la amplificación y clonación de secuencias KS en diferentes aislados de Actinobacterias demostró ser una estrategia efectiva para seleccionar cepas con la capacidad metabólica de producir compuestos nuevos.

Una vez seleccionadas las cepas con potencial metabólico distinto, otras estrategias biotecnológicas permitirán buscar condiciones de fermentación capaces de activar las rutas metabólicas nuevas y expresar los metabolitos de interés. Sin embargo, el gran filtro de encontrar a nivel molecular Actinobacterias que representan variantes metabólicas, minimizara el redundante reaislamiento de compuestos ya conocidos, característico del método tradicional de aislar, purificar y elucidar los compuestos químicos en aislados de Actinobacterias únicamente por haber sido aisladas de fuentes distintas.

En este trabajo es la primera vez que se observa la abundancia de Actinobacterias cultivables que requieren agua de mar para crecer a lo largo de la costa oeste del Golfo de California, México. Este mar con características únicas, con aguas tropicales con alta concentración de nutrientes, puede permitir un aislamiento geográfico (diversificación alelopática) en los microorganismos como es el caso de *S. arenicola* secuencia tipo 'A' y 'B' o "*S. pacifica*" secuencias estándar, 'C' y 'M' o como el taxón nuevo encontrado

relacionado al género *Streptomyces*. Es evidente que taxones nuevos de Actinobacterias residen en el ambiente marino los cuales pueden ser usados con fines biotecnológicos.

8. CONCLUSIONES

- 1.- Las Actinobacterias aisladas y analizadas del sedimento marino del Golfo de California y de Bahía de Todos Santos se agruparon en 55 unidades taxonómicas operacionales (UTOs) con un porcentaje de similitud de secuencia de 100 %, 37 UTOs a un 99 % de similitud y 27 UTOs a un 98 % similitud de secuencia del 16S ARNr indicando la gran diversidad de Actinobacterias cultivables.
- 2.- Las cepas aisladas en el Golfo de California representan 44, 9 y 3 UTOs nuevos a un 100%, 99% y 98% de similitud de secuencia en el 16S ARNr respectivamente; las cuales están relacionados a los géneros *Saccharomonospora*, *Salinispora*, *Streptomyces*, *Verrucospora*, *Micromonospora* y *Actinomadura*.
- 3.- Las cepas aisladas en el Bahía de Todos Santos representan 6 UTOs los cuales presentaron un 99% de similitud de secuencia en el 16S ARNr a Actinobacterias de origen terrestre relacionados a los géneros *Streptomyces*, *Nocardia* y *Micromonospora*.
- 4.- En este trabajo es la primera vez que se observa la abundancia y diversidad de Actinobacterias cultivables que requieren agua de mar para crecer a lo largo de la costa oeste del Golfo de California, México; las cuales están relacionadas a los géneros *Salinispora* y *Streptomyces*.

5.- Cepas relacionados a la especie "*S. pacifica*" se aislaron por primera vez en el Golfo de California, los cuales, tienen una diversidad intra-específica en el 16S ARNr de un 99.77% de similitud entre ellos; incluyendo "*S. pacifica*" secuencia tipo 'C' (cepa AMS178, HQ873947), "*S. pacifica*" secuencia estándar (cepa AMS365, HQ873949) y una sin precedentes clasificada como "*S. pacifica*" secuencia tipo 'M' (cepa AMS301, HQ873948).

6.- Las diferentes especies encontradas como *S. arenicola* 'A' y 'B', "*S. pacifica* M" o el nuevo taxón encontrado relacionado al género *Streptomyces* indican una posible selección geográfica de nuevos taxones de Actinobacterias que residen en el Golfo de California.

7.- En todos los géneros se encontraron cepas de Actinobacterias con bioactividad anticáncer y antibiótica; y en diferentes localidades desde 0 hasta 300m de profundidad; los cuales pueden ser usados con fines biotecnológicos.

8.- El análisis de las secuencias KS en cepas del género *Salinispora* indicó que filotipos diferentes de una misma especie pueden producir diferentes juegos de derivados policétidos de metabolitos secundarios nuevos.

9. REFERENCIAS

- Agongué H, Casamayor EO, Bourain M, Obemosterer I, Joux F, Herndl GJ, Lebaron P. 2005. A survey on bacteria inhabiting the sea surface microlayer of coastal ecosystems, *FEMS Microbiol Ecol.* 54: 269-280.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215: 403-10.
- Álvarez-Borrego S, Lara-Lara JR. 1991. The Physical Environmental and Primary Productivity of the Gulf of California. Chapter 26 In: Simenit, B.R.T and J.P. Dauphine (eds) *The Gulf and Peninsular Province of the California. Am Assoc Petr Geo Memory.* 47:555-567.
- Anderson AS, Wellington EMH. 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51:797–814.
- Aparicio JF, Molnár I, Schwecke T, König A, Haydock SF, Khaw LE, Staunton J, Leadlay PF. 1996. Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase. *Gene.* 169:9-16.
- Arriaga-Cabrera L, Vázquez-Domínguez E, González-Cano J, Jiménez-Rosenberg R, Muñoz-López E, Aguilar-Sierra V (coords.). 1998. *Regiones prioritarias marinas de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.*

- Asolkar RN, Kirkland TN, Jensen PR, Fenical W. 2010. Arenimycin, an antibiotic effective against rifampin- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. J Antibiot. 63(1): 37–39.
- August PR, Tang L, Yoon YJ, Ning S, Müller R, Yu TW, Taylor M, Hoffmann D, Kim CG, Zhang X, Hutchinson CR; Floss HG. 1998. Biosynthesis of the ansamycin antibiotic rifamycin: deductions from the molecular analysis of the *rif* biosynthetic gene cluster of *Amycolatopsis mediterranei* S699. Chem Biol. 5:69–79.
- Bennett RE, Brindle SA, Giuffre NA, Jackson PW, Kowald J, Pansy FE, Perlman D, Trejo WH. 1962. Production of a novel cytotoxic agent, SQ 15,859, by *Streptomyces chrysomallus*. Antimicrob Agents Chemother 1:169–172.
- Bérdy J. 2005. Bioactive microbial metabolites. J Antibiot. 58:1-26.
- Bevitt DJ, Cortes J, Haydock SF, Leadlay PF. 1992. 6-Deoxyerythronolide-B synthase-2 from *Saccharopolyspora erythraea*. cloning of the structural gene, sequence analysis and inferred domain structure of the multifunctional enzyme. Eur J Biochem. 204:39-49.
- Buchanan GO, Williams PG, Feling RH, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W. 2005. Sporolides A and B: structurally unprecedented halogenated macrolides from the marine actinomycete *Salinispora tropica*. Org Lett. 7:2731-2734.
- Bull AT, Ward AC, Goodfellow M. 2000. Search and discovery strategies in biotechnology: the paradigm shift. Microbiol Mol Biol Rev. 64:573-606.

- Cane DE, Walsh CT, Khosla C. 1998. Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations and mutations. *Science*. 282: 63-68.
- Chang Z, Sitachitta N, Rossi JV, Roberts MA, Flatt PM, Jia J, Sherman DH, Gerwick WH. 2004. Biosynthetic pathway and gene cluster analysis of curacin A, an antitubulin natural product from the tropical marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *J Nat Prod*. 67:1356–1367.
- Davet P, Rouxel F. 2000. Detection and isolation of soil fungi. *Science*, Enfield, New Hampshire. pp 188.
- De la Lanza EG. 2004. Gran escenario de la zona costera y oceánica de México. *Ciencias* 76:4-13.
- Diario Oficial, 2002. Aviso de la secretaria del medio ambiente y recursos naturales, In: El diario Oficial de la Federación, lunes 11 de noviembre de 2002 (Primera Sección) pp 7-52.
- Diario Oficial. 2007. Decreto, En El diario Oficial de la Federación, Martes 5 de junio de 2007 (Segunda Sección) pp 1-16.
- Dimroth P. 1987. Sodium ion transport decarbolyases and other aspects of sodium ion cycling in bacteria. *Microbiol Rev*. 51:320–340.
- Donadio S, Katz L. 1992. Organization of the enzymatic domains in the multifunctional polyketide synthase involved in erythromycin formation in *Saccharopolyspora erythraea*. *Gene*. 111:51-60.
- Ensign JC. 1978. Formation, properties, and germination of actinomycete spores. *Ann Rev Microbiol*. 32:185-219.

- Eustáquio AS, McGlinchey RP, Liu Y, Hazzardb C, Beer LL, Florova G, Ihamadsheh MM, Lechner A, Kale AJ, Kobayashi Y, Reynolds K, Moore BS. 2009. Biosynthesis of the salinosporamide A polyketide synthase substrate chloroethylmalonyl-coenzyme A from S-adenosyl-L-methionine. PANS. 1-6.
- Feling RH, Buchanan GO, Mincer TJ, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W. 2003. Salinosporamide A: A highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus "*Salinospira*". Angew Chem Int. 42:355-357.
- Fenical W, Jensen PR, Palladino MA, Lam KS, Lloyd K, Potts BC. 2009. Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). Bioorganic & Medicinal Chemistry. 17:2175–2180.
- Fenical W, Jensen PR. 2006. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. Nat Chem Biol. 2:666–673.
- Gerner EW, Meyskens FL. 2004. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. Nat Rev Cancer. 4: 781-792.
- Ginger T, Kin SL. 2010. A preliminary investigation on the growth requirement for monovalent cations, divalent cations and medium ionic strength of marine actinomycete *Salinispora*. Appl Microbiol Biotechnol. 86:1525–1534.
- Ginolhac A, Jarrin C, Robe P, Perriere G, Vogel T. 2005. Type I polyketide synthases may have evolved through horizontal gene transfer. J Mol Evol. 60:716–725.

- Gontang EA, Fenical W, Jensen PR. 2007. Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl Environ Microbiol.* 73:3272-3282.
- Gontang EA, Gaudêncio SP, Fenical W, Jensen PR. 2010. Sequence-based analysis of secondary-metabolite biosynthesis in marine Actinobacteria. *Appl Environ Microbiol.* 76:2487–2499.
- Hall TA, Brown JW. 2001. The ribonuclease P family. *Methods Enzymology.* 341: 56-77.
- Han SK, Nedashkovskaya OI, Mikhailov VV, Kim SB, Bae KS. 2003. *Salinibacterium amurskyense* gen. nov., sp. nov., a novel genus of the family *Microbacteriaceae* from the marine environment. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:2061-2066.
- Häse CC, Fedorova ND, Galperin MY, Dibrov PA. 2001. Sodium ion cycle in bacterial pathogens: evidence from cross-genome comparisons. *Microbiol Mol Biol Rev.* 65:353–370.
- Hoffmann D, Hevel JM, Moore RE, Moore BS. 2003. Sequence analysis and biochemical characterization of the nostopeptolide a biosynthetic gene cluster from *Nostoc* sp. GSV224. *Gene.* 311:171-180.
- Hong K, Gao AH, Xie QY, Gao H, Zhuang L, Lin HP, Yu HP, Li J, Yao XS, Goodfellow M, Ruan JS. 2009. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soil and plants in China. *Mar Drugs.* 7:24-44.
- Hopwood DA, 1997, Genetic contributions to understanding polyketide

- synthases. Chemical Reviews. 97:2465-2497.
- Horikoshi K. 1998. Barophiles: deep-sea microorganisms adapted to an extreme environment. Curr Opin in Microbiol. 1:291-295.
- Hozzein WN, Goodfellow M. 2007. *Streptomyces synnematoformans* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a sand dune soil in Egypt. Int J Syst Evol Microbiol 57:2009-2013.
- Jensen PR, Fenical W, Oh, Zeiger. 2007. Species-Specific Secondary Metabolite Production In Marine Actinomycetes of the Genus *Salinispora*. Appl Environ Microbiol. 73:1146-1152.
- Jensen PR, Dwight R, Fenical W. 1991. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. Appl Environ Microbiol. 57:1102–1108.
- Jensen PR, Mafnas C. 2006 Biogeography of the marine actinomycete *Salinispora*. Appl Environ Microbiol. 8:1881–1888.
- Jensen PR. 2010. Linking species concepts to natural product discovery in the post -genomic era. J Ind Microbiol Biotech. 37:219-224.
- Jeong, SY, Shin HJ, Kim TS, Lee HS, Park SK, Kim HM. 2006. Streptokordin, a new cytotoxic compound of the methylpyridine class from a marine-derived *Streptomyces* sp. KORDI-3238. J. Antibiot. 59:234-240.
- Joachim A, Shepard E, Lomovskaya N, Zazopoulos E, Staffa A, Bachmann BO, Huang K, Fonstein L, Czisny A, Whitwam RE, Farnet CM, Thorson JS. 2002. The calicheamicin gene cluster and its iterative type I enediyne PKS. Science. 297:1173-1176.

- John W. Blunt, Brent RC, Wan-Ping H, Murray HG, Munro PT. 2007. Marine natural products. *Nat Prod Rep.* 24:31–86.
- Johnson FH, Harvey EN. 1938. Bacterial luminescence, respiration and viability in relation to osmotic pressure and specific salts of sea water. *J Cell Comp Physiol.* 11:213–232.
- Jongrungruangchok S, Tanasupawat S, Kudo T. 2008. *Micromonospora krabiensis* sp. nov., isolated from marine soil in Thailand. *J Gen Appl Microbiol.* 54:127-133.
- Kaeberlein K, Lewis SS, Epstein. 2002. Isolating uncultivable microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science.* 296:1128-1129.
- Kogure K. 1998. Bioenergetics of marine bacteria. *Curr Opin Biotechnol.* 9:278–282.
- Kwon HC, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W. 2006. Marinomycins a-d, antitumor antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus '*Marinispora*'. *J Am Chem Soc.* 128:1622-1632.
- Li WJ, Zhang YG, Zhang YQ, Tang SK, Xu P, Xu L, Jiang CL. 2005. *Streptomyces sodiiphilus* sp. nov., a novel alkaliphilic actinomycete. *Int J Syst Evol Microbiol.* 55:1329-1333.
- Liu W, Nonaka K, Nie L, Zhang J, Christenson SD, Bae J, Van Lanen SG, Zazopoulos E, Farnet CM, Yang CF, Shen B. 2005. The neocarzinostatin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces carzinostaticus* ATCC 15944 involving two iterative type polyketide synthases. *Chem Biol.* 12:293-302.

- Liu Z, Li Y, Zheng LQ, Huang YJ, Li WJ. 2010. *Saccharomonospora marina* sp. nov., isolated from an ocean sediment of the east China sea. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60:1854-1857.
- Lluch-Cota SE, Aragón-Noriega EA, Arreguín-Sánchez F, Aurióles-Gamboa D, Bautista-Romero JJ, Brusca RC, Cervantes-Duarte R, Cortés-Altamirano R, Del- Monte-Luna P, Esquivel-Herrera A, Fernández G, Hendrickx ME, Hernández-Vázquez S, Herrera- Cervantes H, Kahru M, Lavín M, Lluch-Belda D, Lluch-Cota DB, López-Martínez J, Marinote SG, Nevárez-Martínez MO, Ortega-García S, Palacios- Castro E, Parés-Sierra A, Ponce-Díaz G, Ramírez- Rodríguez M, Salinas-Zavala CA, Schwartzlose RA, Sierra-Beltrán AP. 2007. The Gulf of California: Review of ecosystem status and sustainability challenges. *Progress in Oceanography.* 73:1–26.
- Lo CW, Lai NS, Cheah HY, Wong NKL, Ho CC. 2002. Asian review of biodiversity and environmental conservation. <http://www.arbc.com.my/pdf/art21julysep02.pdf>
- Logan N. 1994. *Bacterial systematics*. Blackwell scientific publications, oxford. pp. 272.
- MacLeod RA, Matula TI. 1961. Solute requirements for preventing lysis of some marine bacteria. *Nature.* 192:1209–1210.
- MacLeod RA, Matula TI. 1962. Nutrition and metabolism of marine bacteria. XI. Some characteristics of the lytic phenomenon. *Can J Microbiol.* 8:883–896.

- MacLeod RA. 1965. The questions of the existence of specific marine bacteria. *Bacteriol Rev.* 29:9–23.
- Makoto H, Haruhiko K, Ikuko K, Hiroshi K, Hiroshi A, Masahiro N. 2005. Biosynthetic origin of the carbon skeleton and nitrogen atom of panamycin-607, a nitrogen containing polyketide. *Biosci Biotechnol Biochem.* 69:315-320.
- Maldonado LA, Fenical W, Jensen PR, Kauffman CA, Mincer TJ, Bull AT, Ward AC, Goodfellow M. 2005. *Salinispora arenicola* gen. nov., sp nov and *Salinispora tropica* sp nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family Micromonosporaceae. *Int J Syst Evol Microbiol.* 55:1759-1766.
- Madigan MT, Martinko JM. 2006. Brock Biology of microorganisms. 11th Ed. Pearson Prentice Hall, USA pp. 956.
- Martin GD, Tan LT, Jensen PR, Dimayuga RE, Fairchild CR, Raventos-Suarez C, Fenical W. 2007. Marmycins A and B, cytotoxic pentacyclic C-glycosides from a marine sediment derived actinomycete related to the genus *Streptomyces*. *J Nat Prod.* 70:1406-1409.
- Masayuki H, Nonomura H. 1987. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil *Actinomycetes*. *J Ferment Technol.* 65:501-509.
- Masayuki T, Colwell RR, Hill RT. 1993. Isolation and diversity of *Actinomycetes* in the Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol.* 997-1002.
- McCarter LL. 2001. Polar flagellar motility of the *Vibrionaceae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 65:445–462.

- Mincer C, Jensen PR, Kauffman CA, Fenical W. 2002. Widespread and persistent populations of a major new marine *Actinomycete* taxon in ocean sediments. *Appl Environ Microbiol.* 68:5005–5011.
- Nagata H, Ochiai K, Aotani Y, Ando K, Yoshida M, Takahashi I, Tamaoki T. 1997. Lymphostin (LK6-A), a novel immunosuppressant from *Streptomyces* sp. KY11783: taxonomy of the producing organism, fermentation, isolation and biological activities. *J Antibiot.* 50:537-542.
- Nakamura T, Kawasaki S, Unemoto T. 1992. Roles of K⁺ and Na⁺ in pH homeostasis and growth of marine *J Gen Microbiol.* 138(6):1271-6
- Nathan A, Magarvey KJM, Bernan V, Dworkin M. 2004. Isolation and characterization of novel marine-derived *Actinomycete* taxa rich in bioactive metabolites. *Appl Environ Microbiol.* 70:7520–7529.
- Natsume M, Tazawa J, Yagi K. 1995. Structure-activity relationship of pamamycin: effects of alkyl substituents. *J Antibiotics.* 48:1159-1164.
- Oh DC, Williams PG, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W. 2006. Cyanosporosides A and B, unprecedented cyclopenta[a]indene glycosides 74 from the obligate marine actinomycete *Salinispora pacifica*. *Org Lett.* 8:1021-1024.
- Olano C, Méndez C, Salas JA. 2009. Antitumor compounds from marine actinomycetes. *Mar Drugs.* 7:210-248.
- Penn K, Jenkis C, Nett M, Udvary DW, Gontang EA, McGlinchey RP, Foster B, Lapidus A, Allen EE, Morre BS, Jensen PR. 2009. Genomic islands link

- secondary metabolism to functional adaptation in marine Actinobacterias. The ISME Journal. 3:1193–1203.
- Perrin CL, Rodgers BL, O'Connor JM. 2007. Nucleophilic addition to a *p*-benzyne derived from an enediyne: A new mechanism for halide incorporation into biomolecules J Am Chem Soc. 129:4795–4799.
- Pommier B, Canbäck I, Riemann KH, Boström K, Simu P, Lundberg A, Tunlid H. 2007. Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton. Mol Ecol. 16:867–880.
- Powers EM. 1995. Efficacy of the Ryu nonstaining KOH technique for rapidly determining Gram reactions of food-borne and waterborne bacteria and yeasts. Appl Environ Microbiol. 61:3756–3758.
- Prieto-Davó A, Fenical W, Jensen PR. 2008. Comparative actinomycete diversity in marine sediments. Aquat Microb Ecol. 52:1–11.
- Roden GI, Groves GW. 1959. Recent oceanographic observations in the Gulf of California. J Mar Res. 18:10-35.
- Satyabatan, Ninan. 1964. Selection of media for isolation of *Streptomyces*. Nature. 4935: 928-929.
- Slezen RJ, Khayatt BI. 2008. Natural Products Genomics. Microbial Biotechnology. 1: 275-282.
- Stach JEM, Maldonado LA, Masson DG, Ward AC, Goodfellow M, Bull AT. 2003. Statistical approaches to estimating bacteria diversity in marine sediments. Appl Environ Microbiol. 69:6189-6200.

- Staley J, Ta AK, 1985. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Ann Rev Microbiol.* 39: 321-46.
- Sujatha P, Bapi Raju KVSN, Ramana T. 2005. Studies on a new marine *Streptomyces* BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Res.* 160:119–126.
- Takefumi H, Motomasa S, Ryosuke F, Yasuko J, Takayuki K, Akira T, Kikuo S. 2005. Isolation of novel bacteria and *Actinomycetes* using soil-extract agar medium *J Biosci Bioeng.* 99:485–492.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 24:1596-1599.
- Tian XP, Tang SK, Dong JD, Zhang YQ, Xu LH, Zhang S, Li WJ. 2009a *Marinactinospora thermotolerans* gen. nov., sp. nov., a marine actinomycete isolated from a sediment in the northern South China Sea. *Int J Syst Evol Microbiol.* 59:948–952.
- Tian XP, Zhang YQ, Li QX, Zhi XY, Tang SK, Zhang S, Li WJ. 2009c. *Streptomyces nanshensis* sp. nov., isolated from the Nansha Islands in the south China sea. *Int J Syst Evol Microbiol.* 59:745–749.
- Tian XP, Zhi XY, Qiu YQ, Zhang YQ, Tang SK, Xu LH, Zhang S, Li WJ. 2009b. *Sciscionella marina* gen. nov., sp. nov., a marine actinomycete isolated

from a sediment in the northern South China Sea. *Int J Syst Evol Microbiol.* 59:222-228.

Udwary DW, Zeigler L, Asolkar RN, Singan V, Lapidus A, Fenical W, Jensen PR, Moore BS. 2007. Genome sequencing reveals complex secondary metabolite in the marine actinomycete *Salinispora tropica*. *PNAS.* 104:10376–10381.

Unemoto T, Tsuruoka T, Hayashi M. 1973. Role of Na⁺ and K⁺ in preventing lysis of a slightly halophilic *Vibrio alginolyticus*. *Can J Microbiol.* 19:563–571.

Williams PG, Asolkar RN, Kondratyuk T, Pezzuto JM, Jensen PR, Fenical W. 2007a. Saliniketals A and B, bicyclic polyketides from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *J Nat Prod.* 70:83-88.

Williams PG, Miller ED, Asolkar RN, Jensen PR, Fenical W. 2007b. Arenicolidas A-C, 26-membered ring macrolides from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *J Org Chem.* 72:5025-5034.

Yi H, Schumann P, Sohn K, Chun J. 2004 *Serinicoccus marinus* gen. nov., sp. nov., a novel actinomycete with L-ornithine and L-serine in the peptidoglycan. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54:1585-1589.

Zhao GZ, Li J, Qin S, Huang HY, Zhu WY, Xu LH, Li WJ. 2010. *Streptomyces artemisiae* sp. nov., isolated from surface-sterilized tissue of *Artemisia annua* L. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60: 27-32.