



Actinobacterias raras: evaluación del potencial anticancerígeno y antibacteriano de metabolitos secundarios

Fátima Yadira Castro Ochoa

Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de Ciencias Marinas
Instituto de Investigaciones Oceanológicas
Ensenada, Baja California

Agosto, 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA



T E S I S

**ACTINOBACTERIAS RARAS: EVALUACIÓN DEL POTENCIAL
ANTICANCERÍGENO Y ANTIBACTERIANO DE METABOLITOS
SECUNDARIOS**

PRESENTADA POR

FÁTIMA YADIRA CASTRO OCHOA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

Aprobada por

Dra. Irma E. Soria Mercado
Directora de tesis

Dra. Nahára Ayala Sánchez
Sinodal

Dr. Miguel Ángel Huerta Díaz
Sinodal

Ensenada, Baja California, Agosto 2014

El presente estudio fue generosamente financiado por el proyecto de CONACYT No. 168484: *Metabolitos secundarios bioactivos de nuevos taxones de Actinobacterias del género Salinispora aislados del sedimento marino*,

Por la Dra. Irma E. Soria Mercado,

Por el Programa de Becas para Estudios de Posgrado de CONACYT,

Por el Programa de movilidad estudiantil de la UABC, y

Por el Dr. Paul Jensen del Centro de Biotecnología Marina y Biomedicina del Scripps.

*...Y sentiré felicidad, como
cuándo un sueño se vuelve
realidad o simplemente haces lo
que deseas hacer...*

*A mi familia, a mi compi y a
mis amigos.*

Agradecimientos especiales

La Dra. Irma por todo su apoyo, gracias por ser mi amiga, un ejemplo de lucha y paciencia que llevaré conmigo por siempre. Gracias por depositar en mi toda su confianza y por creer en mis capacidades.

A los miembros de mi comité de tesis la Dra. Nahára y el Dr. Miguel Ángel por sus sugerencias, comentarios y correcciones hechas a este trabajo, sin ellas hubiera quedado “patas pá arriba”.

Al Dr. Paul Jensen y la M. en C. Natalie Millán Aguiñaga del Centro de Biotecnología Marina y Biomedicina del Scripps, San Diego, por darme oportunidad de realizar la estancia de estudios de la cual obtuve una parte fundamental de esta investigación. Por su confianza depositada y todo su apoyo de inicio a fin.

Al Dr. Alexei F. Licea Navarro y la M. en C. Irasema Oroz Parra de Laboratorio de Inmunología molecular y biotoxinas del CICESE por permitirme trabajar en su laboratorio.

A la Universidad Autónoma de Baja California por la formación de profesionistas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México por el apoyo a los estudiantes que carecemos de recursos para el desarrollo de nuestros estudios de posgrado.

A la Facultad de Ciencias Marinas y a todo su equipo de trabajo por su apoyo y los jalones de orejas.

Al laboratorio de Química Marina de la Facultad de Ciencias Marinas y todos sus integrantes, mis compañeros Dulce, Honorio, Liz y Héctor, con los que compartí alegrías y momentos de estrés.

Dulce gracias por todo tu apoyo, por aguantar vivir conmigo durante nuestra estancia de estudios e igualmente apoyarme hasta el final.

Honorio gracias por esas charlas motivadoras de “vuelve a la realidad”, gracias por tus consejos.

A mis compañeritos de generación Russell, Cristina y Yesy, un gusto compartir esta etapa con todos ustedes.

Compañerito, usted sabe, muchas gracias por ser mi compañero de estudios, tareas, mi amigo de alegrías y estrés. Gracias por tu apoyo y confianza. Te debo sesenta pesos.

A mis amigos inolvidables, Oscar Bonilla, Alejandro, Alin, Esther, Dani, Victor, Marlise, Eugenia, y Aidé por llenar de risas y alegría los momentos de no tesis.

A mi buen Boni también por recibirme con los brazos abiertos cuando llegué a esta ciudad, por las charlas llenas de emociones, por ser siempre tan sincero y honesto, gracias amigo.

Y finalmente, pero no menos importante a mi compi Javi, afortunada soy al poder compartir mi vida contigo, gracias por todo tu apoyo incondicional, por toda la confianza que depositas en mí y por quererme tal como soy.

Resumen

En las últimas décadas, el estudio de los metabolitos secundarios y el descubrimiento de nuevos fármacos de origen natural producidos por actinobacterias marinas han conducido al progreso en el tratamiento de enfermedades humanas y al combate de patógenos humanos resistentes. En México son escasas las investigaciones dirigidas al estudio de estos microorganismos, no obstante, estos estudios han construido bases firmes para el desarrollo en la investigación del potencial bioactivo de las actinobacterias marinas poco estudiadas. Con base en esto, la presente investigación se desarrolló brindando especial interés al potencial bioactivo de los metabolitos secundarios producidos por actinobacterias raras aisladas de sedimentos marinos de diversos sitios de México. Para esto, se emplearon métodos selectivos para el aislamiento de actinobacterias raras. Se evaluó el efecto anticancerígeno y antibiótico de los metabolitos secundarios, en células de cáncer colorectal (HCT-116) y contra la bacteria patógena *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), respectivamente. Los resultados evidencian, por primera vez, la presencia de cepas de actinobacterias con rasgos marinos obligados de los géneros *Actinoalloteichus*, *Nocardiopsis*, *Micromonospora*, *Streptomyces* y *Saccharomonospora*. Así también, se demostró el potencial anticancerígeno de 3 extractos de cepas de *Actinoalloteichus* y *Nocardiopsis*, que presentaron alta bioactividad con concentración inhibitoria máxima media (CI₅₀) de <0.076 µg/mL, y también, se comprobó el potencial antimicrobiano de 6 extractos de cepas de *Salinispora*, *Actinoalloteichus*, *Nocardiopsis* y *Micromonospora* con concentración mínima inhibitoria (CMI) de <1.953 µg/mL. A través de análisis de espectroscopia de masas se identificaron parcialmente cinco tipos de compuestos posiblemente responsables de las más altas bioactividades. En conclusión, se logró el primer registro de cepas de actinobacterias marinas obligadas identificadas en sedimentos de Puerto Vallarta y Veracruz, y se demostró su potencial biotecnológico y biomédico; los alcances obtenidos en esta investigación marcan un camino a seguir en la investigación y descubrimiento en México de nuevos agentes bioactivos aislados de actinobacterias raras poco estudiadas.

Palabras clave: *Actinobacterias, metabolitos secundarios, anticancerígeno, antimicrobiano, marinas obligadas.*

Abstract

In the past decades, the research of secondary metabolites and the discovery of novel bioactive natural products produced by marine actinobacteria have led to the progress of the combat of hard-treat human diseases and pathogens with high resistance. In Mexico, research focused on these microorganisms is scarce; however, these efforts have led to a better development in the study of bioactive potential of less exploited marine actinomycetes. On this basis, the present study was developed providing special interest on the bioactive potential of secondary metabolites of rare actinomycetes isolated from marine sediments of different Mexican locations. For this, selective methods for the isolation of rare actinomycetes were used. The anticancer and antimicrobial activities of the secondary metabolites were evaluated on human colorectal cancer cells, HCT-116, and against the pathogen bacteria methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), respectively. The results evidence, for the first time, the presence of different marine obligated actinomycetes strains in Mexican marine sediments, within the genus *Actinoalloteichus*, *Nocardiopsis*, *Micromonospora*, *Streptomyces* and *Saccharomonospora*. Furthermore, high anticancer activity of three extracts of *Actinoalloteichus* and *Nocardiopsis* strains was measured, with average maximum inhibitory concentration (IC₅₀) of <0.076 µg / mL, and also high antimicrobial activity of six extracts of *Salinispora*, *Actinoalloteichus*, *Nocardiopsis* y *Micromonospora* strains with minimum inhibitory concentration (MIC) of <1.953 µg / mL. Partially, five different chemical compounds were identified through mass spectroscopy, possibly responsible for the highest bioactivities. In conclusion, the first record of new marine obligated actinomycetes strains identified in sediments of Puerto Vallarta and Veracruz, Mexico, was achieved, also their biotechnology and biomedical potential; was demonstrated. These results mark a path within the investigation and discovery in Mexico of new bioactive agents isolated from rare and less studied actinomycetes.

Keywords: *Actinobacteria, secondary metabolites, anticancer, antimicrobial, marine obligated.*

Contenido	Página
Lista de Figuras	xi
Lista de Tablas	xii
Capítulo 1 Introducción	1
1.1 Actinobacterias	2
1.2 Distribución	4
1.3 Actinobacterias marinas y actinobacterias raras	4
1.4 Taxonomía	5
1.5 Importancia Industrial y potencial bioactivo	6
1.6 Producción de metabolitos secundarios	6
1.6.1 Actinobacterias y antibióticos	7
1.6.2 Actinobacterias y agentes anticáncer	10
1.6.3 Otros potenciales biotecnológicos	11
1.7 Métodos de aislamiento de actinobacterias marinas	11
1.8 Identificación	12
1.9 Extracción de metabolitos secundarios	13
Capítulo 2 Actinobacterias en México	14
2.1 Antecedentes nacionales	15
2.2 Justificación	17
2.3 Objetivos	17
2.3.1 Objetivo general	17
2.3.2 Objetivos específicos	18
2.4 Hipótesis	18
Capítulo 3 Metodología	20
3.1 Procedencia de las actinobacterias	21
3.2 Pretratamiento de sedimentos marinos	21
3.3 Métodos de aislamiento y de estampado en placa	22
3.4 Preservación criogénica	24

Actinobacterias raras: evaluación del potencial anticancerígeno y antibacteriano de metabolitos secundarios

3.5	Análisis filogenético del gen 16s ARN ribosomal	24
3.5.1	Extracción de ácido nucleico, amplificación del gen y secuenciación	25
3.6	Selección de actinobacterias raras para extracción y evaluación de metabolitos secundarios	26
3.6.1	Requerimiento obligado de condiciones salinas para crecer.	26
3.7	Extracción de metabolitos secundarios	27
3.8	Evaluación del potencial activo de metabolitos secundarios	29
3.8.1	Actividad anticancerígena	29
3.8.2	Actividad antibacteriana	30
3.9	Identificación preliminar de compuestos bioactivos	32
3.9.1	Cromatografía líquida y espectroscopía de masas (CL-EM)	32
3.10	Análisis estadístico	36
3.11	Nota aclaratoria	36
Capítulo 4	Resultados y discusión	36
4.1	Actinobacterias aisladas e identificadas	39
4.2	Características morfológicas generales de actinobacterias raras	40
4.3	Actinobacterias raras: cepas marinas obligadas	40
4.4	Efecto anticancerígeno y antibacteriano	45
4.5	Compuestos bioactivos	50
Capítulo 5	Conclusiones	63
5.1	Agradecimientos	66
Capítulo 6	Catálogo fotográfico-descriptivo	67
	Referencias	74

Actinobacterias raras: evaluación del potencial anticancerígeno y antibacteriano de metabolitos secundarios

Anexo 1. Actinobacterias de sedimentos marinos de México	86
A.1. Base de datos	87
A.2. Árbol filogenético	90
A.3. Base de datos muestras de sedimentos	91
Anexo 2. Recomendaciones generales	92

Lista de Figuras	Página
Figura 1.1. Ciclo de vida del género más estudiado: <i>Streptomyces</i> .	3
Figura 1.2. Descripción general de la producción de metabolitos durante el crecimiento bacteriano.	7
Figura 3.1. Método en dilución de estampado de sedimento marino y purificación preliminar de actinobacterias.	23
Figura 4.1. Algunos morfotipos de actinobacterias aisladas de sedimentos del Golfo de California y Golfo de México.	40
Figura 4.2. Concentraciones inhibitorias máximas medias (CI ₅₀) en µg/mL de los extractos bioactivos de AcOEt y MeOH contra carcinoma colorectal HCT-116.	45
Figura 4.3. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) en µg/mL de los extractos crudos bioactivos de AcOEt y MeOH contra SARM.	46
Figura 4.4. Identificación de los picos relacionados a la matriz del medio de cultivo.	49
Figura 4.5. Cromatograma y espectro de masas del extracto PV-3b (AcOEt) <i>Actinoalloteichus</i> sp. Fragmentos de masas correspondientes a los compuestos citotóxicos cyanogriside A y D.	50
Figura 4.6. Cromatograma y espectro de masa del extracto PV-3b (AcOEt) <i>Actinoalloteichus</i> sp. Fragmentos de masas correspondientes al compuesto citotóxico caerulomicina H.	50

- Figura 4.7. Cromatograma y espectro de masa del extracto V-1b (AcOEt) *Actinoalloteichus* sp. Fragmentos de masas correspondientes al compuesto citotóxico caerulomicina A. 51
- Figura 4.8. Cromatograma y espectro de masa de extracto V-1b (AcOEt) *Actinoalloteichus* sp. Fragmentos correspondientes al compuesto citotóxico caerulomicina K. 51
- Figura 4.9. Cromatograma y espectro de masa del extracto V-3b (AcOEt) *Nocardiosis* sp. Fragmentos de masas correspondientes al compuesto citotóxico, antibacteriano, antifúngico 4,7-Bis (4-metoxifenil)-6-hidroxi-5-metoxibenzo[d]tiazol. 53
- Figura 4.10. Cromatograma y espectro de masa del extracto PV-10b (AcOEt) *Nocardiosis* sp. Fragmentos de masas correspondientes al compuesto citotóxico, antibacteriano, antifúngico 4,7-Bis(4-metoxifenil)-6-hidroxi-5-metoxibenzo[d]tiazol 53
- Figura 4.11. Cromatograma y espectro de masa del extracto V-3b (AcOEt) *Nocardiosis* sp. Fragmentos de masas correspondientes al compuesto citotóxico lucentamicina B. 54
- Figura 4.12. Cromatograma y espectro de masa del extracto PV-10b (MeOH) *Nocardiosis* sp. Fragmentos de masas correspondientes al compuesto citotóxico ácido 1-Hidroxi-4-metoxi-2-naftoico. 55
- Figura 4.13. Cromatograma y espectro de masa del extracto PV-10b (MeOH) *Nocardiosis* sp. Fragmentos de masas correspondientes al compuesto citotóxico lucentamicina B. 55

Lista de Tablas	Página
Tabla 1.1. Número aproximado de antibióticos producidos por <i>Streptomyces</i> y Actinobacterias raras.	8
Tabla 3.1. Métodos de aislamiento. Componentes de los seis medios de cultivos seleccionados para el aislamiento de actinobacterias raras.	22
Tabla 4.1. Géneros relacionados con las 82 cepas analizadas en el estudio. Número total de cepas por género y sitio de origen.	38
Tabla 4.2. Cepas de actinobacterias marinas obligadas por género.	41
Tabla 4.3. Compuestos bioactivos producidos por algunas especies de los géneros raros <i>Actinoalloteichus</i> y <i>Nocardiopsis</i> .	51

Hoja en blanco

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Marco teórico.

Capítulo 1 Introducción

Hace más de medio siglo que los microorganismos marinos se convirtieron en un valioso objeto de estudio dentro de la búsqueda de productos naturales novedosos y bioactivos (Blunt *et al.*, 2007). Desde siempre el rango de productos naturales explotables ha sido mucho más amplio que el de los productos farmacéuticos y sus derivados. Aunque éstos dominan el mercado, los recursos biotecnológicos que proveen los microorganismos terrestres y marinos son únicos y están lejos de ser completamente agotados (Bull *et al.*, 2005).

Más del 70% de la superficie de nuestro planeta está cubierto por océanos, y aunque la diversidad de la vida en el medio terrestre es amplia, la mayor biodiversidad se encuentra en los océanos (Donnia y Hamann, 2003). Las condiciones en el medio marino son extremadamente diferentes a las del medio terrestre, lo a su vez se ve reflejado en la diversidad genética y metabólica de los microorganismos ya que poseen características diferentes de aquellos que son terrestres lo que ocasiona que produzcan diferentes tipos de productos naturales bioactivos (Imada *et al.*, 2007).

1.1. Actinobacterias

El *filo Actinobacteria* es un grupo muy amplio de microorganismos y muchos de sus integrantes han jugado un papel muy valioso a lo largo del progreso en el entendimiento y tratamiento de las enfermedades. Gracias a la tenacidad de los hombres de ciencia, a lo largo de este proceso se ha descubierto por prueba y error que las actinobacterias producen una variedad de productos naturales con potencial biotecnológico y biomédico.

Las actinobacterias son microorganismos en su mayoría aeróbicos, no móviles, filogenéticamente relacionados con las bacterias (Goodfellow y Williams, 1983) y originalmente consideradas como un grupo intermedio entre las bacterias y los hongos. Sin embargo, estos microorganismos son actualmente reconocidos como procariotas, bacterias en su mayoría Gram-positivas. La mayoría de ellas posee un alto contenido de guanina y citosina en su genoma (72%), pero algunos

miembros cosmopolitas aislados de agua dulce poseen menor contenido de estos compuestos (~42%) (Ghai *et al.*, 2012). El *filo* posee integrantes dotados de la capacidad de sintetizar más del 80% de los antibióticos de origen natural actualmente descubiertos (Procópio *et al.*, 2012). Algunas de las estructuras morfológicas que los caracterizan son las estructuras filamentosas llamadas hifas, las cuales forman un micelio tipo sustrato y tipo aéreo. El micelio aéreo puede funcionar como soporte para las esporas y, dependiendo del género, puede poseer mayor diámetro que el micelio sustrato (Figura 1). Las esporas son resistentes a la desecación y pueden sobrevivir en el suelo en estado viable durante largos periodos de tiempo (Horinouchi, 2002). Esta etapa del ciclo de vida es resistente a las condiciones ambientales adversas, tal como la carencia de nutrientes.

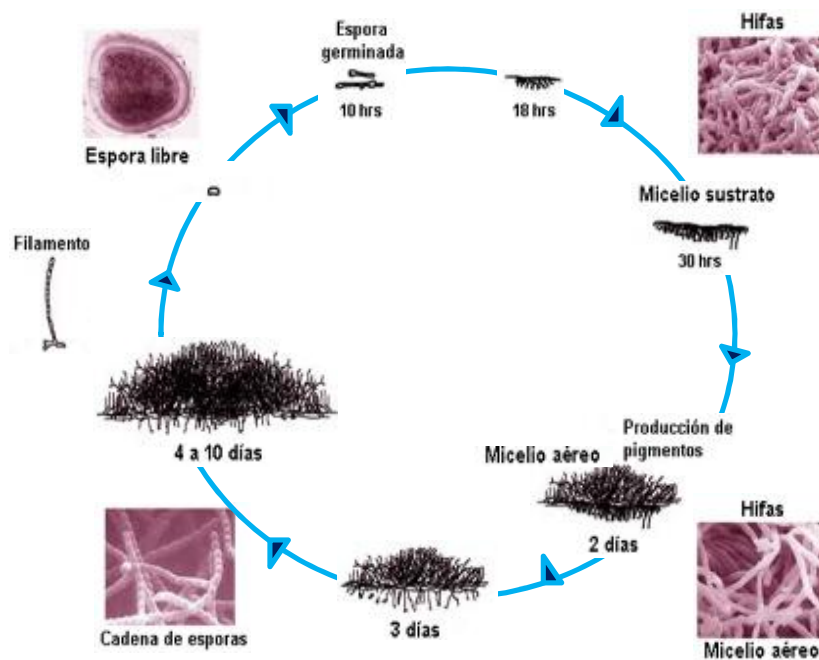


Figura 1.1. Ciclo de vida del género más estudiado: *Streptomyces*. Las hifas sustrato frecuentemente se forman a partir de la germinación de un fragmento de esporas. El micelio aéreo se forma a partir del reuso de material asimilado por las hifas del micelio sustrato. Los septos o fragmentos se forman para crear muchos compartimentos unigenómicos, los cuales después se desarrollan como cadenas de esporas. Se muestran imágenes de barrido electrónico para cada etapa de crecimiento, así como la progresión del micelio sustrato a micelio aéreo, cuando se activa la producción de metabolitos secundarios. Modificado de Horinouchi (2002).

1.2. Distribución

Las actinobacterias poseen una distribución global, pero son consideradas principalmente terrígenas debido a su amplia manifestación y abundancia en el suelo. Sin embargo, se ha demostrado que las actinobacterias pueden ser aisladas de ambientes costeros y del océano profundo (Helmke y Weyland, 1984; Jensen *et al.*, 1991; Takizawa *et al.*, 1993; Moran *et al.*, 1995; Colquhoun *et al.*, 1998, Sivakumar, 2001 y Tae *et al.*, 2005).

1.3. Actinobacterias marinas y actinobacterias raras.

Durante muchos años la distribución de las actinobacterias en el medio ambiente acuático permaneció sin descripción ya que se consideraba que eran originarias de esporas latentes que se lavaron desde la tierra (Goodfellow y Williams, 1983). Actualmente, se ha establecido que poblaciones específicas de actinobacterias existen en el medio marino y que se agregan significativamente a la diversidad marina dentro de un amplio rango de taxones (Stach *et al.*, 2004).

Aunque no está del todo entendido el papel ecológico de las actinobacterias marinas, al igual que las actinobacterias terrestres, están implicadas en la descomposición de materiales orgánicos (Sivakumar, 2001), por lo que se considera que juegan un papel vital en la transformación de la materia orgánica y el ciclo del carbono. La adaptación que desarrollaron los actinomicetos al ambiente marino dio como resultado que algunos de estos microorganismos mostraran un requerimiento de agua de mar para su crecimiento. Hoy en día esto los diferencia de sus contrapartes terrestres (Fenical *et al.*, 2009), y las caracteriza como actinobacterias raras, géneros raros cuya frecuencia de aislamiento por métodos convencionales es mucho menor en comparación con el género más estudiado (*Streptomyces*), y cuyas características morfológicas difieren de las de este género. Hasta el año 2010, las actinobacterias raras abarcaban alrededor de 220 géneros (Tiwari y Gupta, 2012).

Durante la primera década de este siglo se reportó el primer género marino obligado (*Salinispora*), un género raro que requiere exclusivamente de agua de mar para crecer (Mincer *et al.*, 2002, 2005). Subsecuentemente se han reportado otros géneros raros marinos obligados poco estudiados, como *Nocardiopsis*, *Nocardioides*, *Kocuria*, *Dietzia* y *Saccharopolyspora* (Pimentel-Elardo *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2014), además de muchos otros que poseen requerimientos de agua de mar no estrictos (*Streptomyces*, *Saccharomonospora*, *Rhodococcus*, *Nocardiopsis*, *Streptomycetaceae*, *Micromonospora*, *Pseudonocardia*, *Streptosporangium* y *Actinoalloteichus*) (Jensen *et al.*, 1991; Mincer *et al.*, 2002; Kokare *et al.*, 2004; Magarvey *et al.*, 2004; Mahyudin, 2008). Este tipo de descubrimientos han mostrado que las actinobacterias marinas poseen rasgos y/o adaptaciones evolutivos que las hacen capaces de producir metabolitos secundarios únicos, gracias a su sobrevivencia tan exitosa (Engelhardt *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2010).

1.4. Taxonomía

Actualmente el *phylum Actinobacteria* se divide en 5 subclases; *Acidimicrobidae*, *Actinobacteridae*, *Coriobacteridae*, *Nitriliruptoridae* y *Rubroacteridae*. La mejor conocida es la subclase *Actinobacteridae* que incluye el orden *Actinomycetales* con sus miembros comúnmente referidos como actinomicetos. Los actinomicetos son las actinobacterias mejor estudiadas (Jensen y Lauro, 2008), tan solo al género más conocido (*Streptomyces*) se le atribuye el 75% del total de productos naturales reportados hasta el 2005 (Jensen *et al.*, 2005). Es más, se ha determinado que a pesar de ser el género más estudiado, solo se han descubierto un 10% del total de productos naturales que puede producir (Watve *et al.*, 2001). Datos recientes de estudios sobre cultivo de procariontes (cultivos-dependientes) han demostrado la existencia en el océano de actinobacterias marinas autóctonas. Entre ellas están incluidos miembros de los géneros *Dietzia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Salinispora*, *Marinophilus*, *Solwaraspora*, *Salinibacterium*, *Aeromicrobium marinum*, *Williamsia maris* y

Verrucosisspora (Stach *et al.*, 2003, Magarvey *et al.*, 2004, Bull *et al.*, 2005, Jensen *et al.*, 2005a, 2005b).

1.5. Importancia industrial y potencial bioactivo

Se estima que únicamente se han descubierto el 3% del total de productos naturales con alto potencial bioactivo sintetizados por estos microorganismos (Gontang *et al.*, 2010). Actualmente, el interés industrial y biotecnológico en bacterias provenientes de hábitats marinos va en aumento, gracias al incremento en el número de sustancias biológicamente activas aisladas de estos microorganismos. Las actinobacterias emplean un sistema de comunicación química muy sofisticado en respuesta a las condiciones del medio y a las características de su crecimiento. Este sistema modula la expresión de los genes biosintéticos que poseen y con los cuales se activa el metabolismo secundario. Con la activación del metabolismo secundario muchas sustancias orgánicas químicamente diversas (la mayoría de bajo peso molecular) son producidas por las actinobacterias (Bull *et al.*, 2005). A los productos del metabolismo secundario también se les conoce como metabolitos secundarios.

Se ha descubierto que los compuestos aislados de estos microorganismos poseen un efecto importante en la salud, la nutrición y la economía de nuestra sociedad, ya que entre estos se incluyen antibióticos, agentes antitumorales, antioxidantes, pigmentos, toxinas, efectores de la competencia ecológica y la simbiosis (feromonas), inhibidores enzimáticos, agentes inmunomoduladores, antagonistas y agonistas de receptores, pesticidas, y promotores del crecimiento de animales y plantas, entre otros (Jensen y Lauro, 2008).

1.6. Producción de metabolitos secundarios

Se ha reportado que el metabolismo secundario de las actinobacterias se activa entre el cuarto y décimo día de crecimiento en cultivo (Pandey *et al.*, 2005, Lin *et al.*, 2005) dependiendo del género. La activación del metabolismo secundario está estrechamente relacionada con el agotamiento de nutrientes, la

inactivación e inducción enzimática, y/o con la disminución de la tasa de crecimiento (Karanja, 2012). Estos eventos generan señales en efecto cascada, originando la diferenciación en la regulación química (Demain, 1998) gracias a la expresión de los genes biosintéticos que poseen, dando lugar a los metabolitos secundarios durante la idiofase, representada por la fase estacionaria del crecimiento, una vez que el crecimiento ha cesado (Figura 1.2).

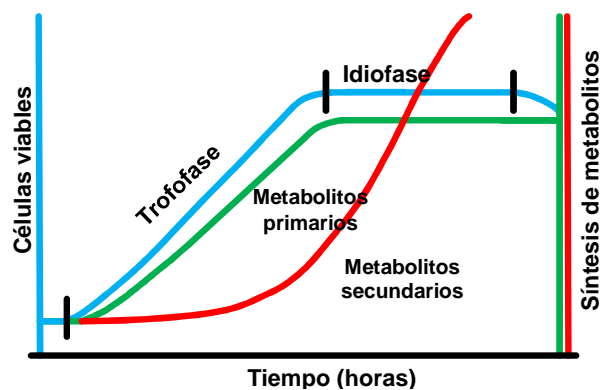


Figura 1.2. Descripción general de la producción de metabolitos durante el crecimiento bacteriano.

En la literatura se reportan otros factores importantes a considerar como señales de la producción de los metabolitos secundarios. Por ejemplo, en el género *Streptomyces* la producción de dichas sustancias generalmente coincide o aparece ligeramente antes del desarrollo de las hifas del micelio aéreo, usualmente durante la fase estacionaria o en las etapas de crecimiento lento (Alexandra, 1997). Se ha reportado que la señal ambiental más importante para la activación del metabolismo secundario para este género en particular es la falta de fosfato en el medio (Sola-Landa *et al.*, 2003).

1.6.1. Actinobacterias y antibióticos

La difusión de bacterias resistentes a antibióticos y la aparición de nuevas enfermedades (e.g., influenza aviar A H5N1) y patógenos (e.g., *Enterobacteriaceae* resistente a carbapenemas), se ha convertido en un problema

de salud pública alrededor del mundo. En México, se ha reportado que la creciente resistencia antibiótica de bacterias patógenas es un problema que quizá está relacionado con el uso inapropiado de antibióticos (Dresler *et al.*, 2008).

Esta problemática nacional y global es combatida, por una lado, con la concientización en el uso adecuado de los antibióticos, y por otro, con el hallazgo de nuevos compuestos con potencial antibiótico.

La definición clásica de un antibiótico es que es un compuesto producido por microorganismos que inhibe el crecimiento de otro microorganismo (Moyer y Coghill, 1946). Desde el descubrimiento de la estreptomina, producido por el actinomiceto *Streptomyces griseus*, un alto número de antibióticos (aminoglucósidos, cloranfenicol, tetraciclinas, macrólidos, y cefamicinas β -lactámicos) efectivos contra diversos patógenos han sido aislados de cultivos de géneros como *Streptomyces* y *Streptoverticillium* (Atlas de actinomicetos, La Sociedad para actinomicetos, Japón, 1997), evidenciando su valor biotecnológico y una de las razones principales por las cuales las actinobacterias son objeto de estudio.

Se han aislado muchos antibióticos de actinobacterias marinas (Bernan *et al.*, 1994, Bibiani *et al.*, 1997, Woo *et al.*, 2002, Maskey *et al.*, 2002, 2003, Charan *et al.*, 2004, Li *et al.*, 2005, Buchanan *et al.*, 2005, Lombo *et al.*, 2006, Adinarayana *et al.*, 2006, Lam *et al.*, 2006), muchos nuevos y otros únicos comparados con aquellos aislados de actinobacterias terrestres (Meiying y Zhicheng, 1998). El descubrimiento de estas nuevas moléculas ha marcado una época en la investigación de antibióticos y el desarrollo subsecuente en el área de la quimioterapia.

Por otra parte, el enfoque del estudio industrial se ha movido a los microorganismos menos explotados que incluye géneros raros de actinobacterias tales como *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Dactylosporangium*, *Kibdelosporangium*, *Microbispora*, *Micromonospora*, *Planobispora*, *Streptosporangium*, y *Planomonospora* (Qin *et al.*, 2009, Subramani y Albersberg, 2013). Sin embargo, se continúa con el estudio tanto de los géneros raros como

Actinobacterias raras: evaluación del potencial anticancerígeno y antibacteriano de metabolitos secundarios

de aquellos más estudiados, pues la evidencia del potencial biosintético de las actinobacterias marinas se ha fortalecido con el paso del tiempo (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Número aproximado de antibióticos producidos por el género *Streptomyces* y actinobacterias raras.

Género	1974	1980	1984	1988	2005^a
<i>Streptomyces</i>	1,934	2,784	3,477	4,876	6,550
<i>Actinomycetos raros</i>	125	361	745	1,276	2,250
<i>Micromonospora</i>	41	129	269	398	740
<i>Nocardia</i>	45	74	107	262	357
<i>Actinomadura</i>	0	16	51	164	345
<i>Actinoplanes</i>	6	40	95	146	248
<i>Streptoverticillium</i>	19	41	64	138	258
<i>Streptosporangium</i>	7	20	26	39	79
<i>Microbispora</i>	4	6	6	10	54
<i>Datylosporangium</i>	0	4	19	31	58
<i>Saccharopolyspora</i>	0	4	33	44	131
<i>Actinosynnema</i>	0	0	25	14	51
<i>Streptoalloteichus</i>	0	3	14	12	48
<i>Actinomyces</i>	0	14	17	-	-
<i>Pseudonocardia</i>	0	3	8	-	27
<i>Micropolyspora</i>	2	4	7	-	13
<i>Thermomonospora</i>	1	3	4	-	19
<i>Kitasatosporia</i>	0	0	0	11	37
<i>Kibdelosporangium</i>	0	0	0	7	34

Tomado de Subramani y Albersberg, (2013).

^a Número de metabolitos bioactivos de actinomycetos raros.

Una herramienta utilizada en la investigación de nuevos antibióticos es el método cuantitativo conocido como Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (Andrews, 2001). Con este método es posible determinar la actividad *in vitro* de nuevos antimicrobianos arrojando la concentración mínima precisa requerida para inhibir el crecimiento de un patógeno dado (Matrus y Wheeler, 2001). Para emplear esta herramienta se deben utilizar estándares de antibióticos, por ejemplo, el antibiótico vancomicina (VA), aislado de la actinobacteria *Nocardia orientalis*, efectivo sobre la bacteria patógena *Staphylococcus aureus* (SA) causante de muchas infecciones humanas de difícil tratamiento. La vancomicina posee una CMI dentro del rango 0.5 – 2 µg/mL. La interpretación de la resistencia

de SA a este antibiótico se puede describir en tres niveles de efectividad: (1) susceptible (S) a la vancomicina con un CMI de 0.5 a 4 µg/mL; (2) intermedio (I), con un CMI de 8 a 16 µg/mL; y (3) resistente (R) a la vancomicina si presenta un CMI > 32 µg/mL. Esta interpretación es conocida como S-I-R (Aucoin, 2000).

1.6.2. Actinobacterias y agentes anticáncer

El cáncer es un término que se refiere a un gran grupo de más de 100 enfermedades diferentes que involucran la proliferación incontrolada de células anormales (Capón *et al.*, 2000). Hoy en día, el cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo, afectando a una de cada tres personas y resultando en una de cada cinco muertes en el mundo (Organización Panamericana de la Salud, 2013; INEGI, 2014). En México, según la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC), el cáncer es la tercera causa de muerte y se estima que cada año se detectan 128 mil nuevos casos (Secretaría de Salud, 2013; Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, 2013).

Está más que evidenciada la urgente necesidad de descubrir nuevos agentes terapéuticos antiproliferativos para combatir esta enfermedad. Gracias al avance científico en la investigación de los metabolitos secundarios producidos por actinobacterias marinas, hoy en día también son reconocidas por la producción de diferentes metabolitos secundarios con aplicaciones anticancerígenas. Se han aislado varias clases de compuestos citotóxicos (Georis *et al.*, 2000; Maskey *et al.*, 2004; Stritzke *et al.*, 2004; Lang *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005; Manam *et al.*, 2005; Soria-Mercado *et al.*, 2005 y Jeong *et al.*, 2006), los cuales han mostrado una actividad significativa contra diferentes tipos de cáncer. Al igual que los antibióticos, estos compuestos han marcado una época en el desarrollo y comercialización de fármacos para combatir y prevenir el cáncer, fortaleciendo la calidad y esperanza de vida de millones de personas alrededor del mundo.

1.6.3. Otros potenciales biotecnológicos

Existe una amplia gama de productos de interés farmacéutico y comercial descubiertos en actinobacterias marinas como las melaninas, diversas enzimas (amilasas, proteasas, celulosa, quitina, queratina, xilanasas) e inhibidores enzimáticos (Manivasagan *et al.*, 2013). Las melaninas son pigmentos naturales complejos, frecuentemente utilizadas en medicina, farmacología y preparación de cosméticos (Dastager *et al.*, 2006). Poseen muchas funciones biológicas, incluyendo foto protección, termorregulación, acción como sumideros de radicales libres, queladores de cationes y antibióticos (Lin *et al.*, 2005). Las actinobacterias marinas sintetizan y excretan pigmentos oscuros, melaninas o melanoideas, los cuales son considerados como características útiles en los estudios taxonómicos (Zonoba 1965; Arai y Mikami, 1972; Butler y Day, 1998; Clancy y Simon, 2001). Por otra parte, las actinobacterias marinas también poseen una gama diversa de actividades enzimáticas y son capaces de catalizar varias reacciones bioquímicas (Pandey *et al.*, 2005). Las amilasas son enzimas de gran importancia en la biotecnología actual con aplicaciones en las industrias de alimentos, fermentación, textiles y papel. La ocurrencia de amilasas en las actinobacterias es una característica observada comúnmente en *Streptomyces* (Vigal *et al.*, 1991). Respecto a los inhibidores enzimáticos, las actinobacterias marinas son fuentes potenciales de la producción de estos agentes, entre los cuales se han reportado aquellos que inhiben la β -glucosidasa, N-acetyl-b-D-glucosaminidasa, piroglutamil peptidasa, y α -amilasa (Fernández *et al.*, 2002; Imade, 2005).

1.7. Métodos de aislamiento de actinobacterias marinas

En las técnicas convencionales de aislamiento de actinobacterias deben considerarse muchos factores, principalmente, la elección de la fuente de las propias actinobacterias, el medio nutritivo de aislamiento, las condiciones de cultivo y el reconocimiento adecuado de las colonias candidatas para un aislamiento primario.

En el medio marino las fuentes de actinobacterias son muy diversas, ya que se han aislado actinobacterias que viven en simbiosis con corales blandos, peces, algas, tunicados, y en manglares. Sin embargo, las esponjas y los sedimentos son las fuentes con mayor contribución al aislamiento de estos microorganismos, con un 22% y 45%, respectivamente (Abdelmohsen *et al.*, 2014).

Por ejemplo, para el aislamiento de actinobacterias de sedimentos marinos (costeros o profundos) se emplean pre-tratamientos que incluyen secados y calentamientos para estimular el aislamiento de actinobacterias raras (Sahu *et al.*, 2007). Un enfoque alternativo que hace más selectivo el procedimiento de aislamiento involucra la adición de químicos tales como el fenol a la suspensión de sedimentos (Lingappa y Lockwood, 1961). Se han recomendado muchos medios nutritivos para el aislamiento de actinobacterias de muestras marinas, algunos especializados en aislar géneros específicos de actinobacterias raras, utilizando macromoléculas como la caseína, quitina, hidrolizado de cabello y el ácido húmico como fuente de carbono y nitrógeno (Hayakawa y Nonomura, 1987a; 1987b; Cho *et al.*, 1994,). Muchos antibióticos también son utilizados en medios selectivos para estimular el crecimiento y/o inhibir microbios no deseados, incluyendo las bacterias de crecimiento rápido y los hongos (Maldonado *et al.*, 2005; Jensen *et al.*, 2007; Becerril-Espinosa *et al.*, 2012).

1.8. Identificación

Las actinobacterias pueden ser parcialmente identificadas de acuerdo a sus rasgos morfológicos. Estos incluyen las características de las colonias en las placas de agar (morfología colonial), tal como la forma del micelio sustrato, las hifas aéreas y la morfología de las esporas. También, por los pigmentos que producen, los componentes de la pared celular y el patrón de azúcares de toda la célula.

La identificación a nivel de género o especie se puede llevar a cabo a través de una identificación fenotípica y/o genotípica. La identificación fenotípica tradicional (e.g., perfil de ácidos grasos celulares y/o utilización de fuentes de

carbono) es difícil, puede consumir mucho tiempo y la interpretación de los resultados normalmente implica un análisis subjetivo (Tang *et al.*, 1998). Por otro lado, la identificación genotípica es confiable y rápida, involucra el uso de secuencias de genes filogenéticamente informativos, tal como el gen ARNr 16S (subunidad menor del ARN ribosomal en células procariotas de ~1500 pares de bases), presente en casi todas las bacterias, considerado el marcador más común utilizado para estudiar la filogenia y taxonomía bacteriana (Janda y Abbot, 2007). Es por esta razón que la identificación de las actinobacterias actualmente es confirmada a través de análisis moleculares de este gen (Okami *et al.*, 1976; Nonomura 1988; Hayakawa *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1995).

1.9. Extracción de metabolitos secundarios

Los métodos de aislamiento y purificación de las sustancias químicas producidas por estos microorganismos involucran la ruptura celular, centrifugación, micro y ultrafiltración, precipitación, partición líquido-líquido y/o técnicas cromatográficas (Gu, 2000). La partición o extracción líquido-líquido es ampliamente recomendada por la IUPAC, debido a su bajo costo y a que puede llevarse a cabo a gran escala. También se han desarrollado adsorbentes poliméricos porosos esféricos (resinas), como el poliestireno macrorreticular, alifático, o el condensado de fenol-formaldehído, cuyas superficies internas pueden adsorber y desorber una amplia variedad de moléculas (solutos) en función del entorno en el que se utilizan (Rohm y Haas Company, 2000). Por ejemplo, en disolventes polares tales como el agua, los adsorbentes poliméricos exhiben un comportamiento no polar o hidrofóbico y así pueden adsorber especies orgánicas que son escasamente solubles. Por otro lado, si un soluto se adsorbió originalmente de un medio puramente acuoso (e.g., cultivos líquidos bacterianos), el uso de un disolvente como acetona o metanol podría interrumpir la interacción entre la resina y el soluto, resultando en una mejor solvatación del soluto (e.g., antibióticos) en el solvente orgánico (Rohm y Haas Company, op. cit.).

CAPÍTULO 2

ACTINOBACTERIAS MARINAS EN MÉXICO

Antecedentes nacionales en la investigación de actinobacterias marinas.

Justificación, hipótesis y objetivos del estudio.

Capítulo 2 Actinobacterias marinas en México

2.1. Antecedentes nacionales

Recientemente, Maldonado et al. (2009) identificaron 300 cepas aisladas de sedimentos marinos del Golfo de México y Golfo de California relacionadas con los géneros *Actinomadura*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Micromonospora*, *Nonomuraea*, *Rhodococcus*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Salinispora*, *Streptomyces*, y *Verrucosipora*. Este trabajo fue uno de los primeros en evidenciar la diversidad actinobacteriana encontrada en sedimentos marinos de México. Posteriormente, Villarreal-Gómez et al. (2010) realizaron una investigación relacionada con el potencial bioactivo de algas marinas y extractos crudos de las bacterias asociadas a ellas, logrando identificar tres filos diferentes asociados a la superficie de las algas (*Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*). Estos investigadores aislaron solo cinco cepas de actinobacterias (Cf2, Eb3, Sm2, Em6 y Cc5) y demostraron el efecto anticancerígeno (contra carcinoma colorectal HCT-116) y antimicrobiano (contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis*) de sus extractos crudos. Únicamente dos extractos presentaron efectos antiproliferativos de bajo nivel, con concentraciones inhibitorias máximas medias (CI₅₀) de entre 56 y 58 µg/mL. La CI₅₀ representa la concentración de un compuesto necesaria para una inhibición celular *in vitro* del 50%. Solo un extracto crudo presentó efecto antibacteriano, inhibiendo ligeramente el crecimiento de *Proteus mirabilis* con una CMI de 163.7 µg/mL. Ninguna de las 5 cepas presentó bioactividad contra *Staphylococcus aureus* o *Pseudomonas aeruginosa*.

Otros autores (Becerril-Espinosa *et al.*, 2012; Torres-Beltrán *et al.*, 2012) han reportado información acerca del potencial que tiene el Golfo de California (GC) como fuente de actinobacterias marinas bioactivas. Becerril-Espinosa *et al.* (2012) aislaron 1,497 cepas de actinobacterias de sedimentos costeros y profundos (20 a 300 m) e identificaron especies de diversos géneros raros con diversas metodologías. Algunas cepas presentaron hifas aéreas, coloraciones

naranjas y producción de esporas negras, las cuales estaban relacionadas con géneros raros como *Micromonospora*, *Salinispora*, *Nonomuraea* y *Verrucospora*. Estos mismos autores describieron otras cepas con hifas aéreas bien desarrolladas de los géneros raros *Actinomadura*, *Saccharomonospora*, *Streptomyces* y *Nocardiopsis*. Becerril-Espinosa *et al.* (2012) también evaluaron el potencial anticancerígeno de especies del género *Streptomyces* aisladas de sedimentos de la Bahía de Todos Santos (Pacífico Mexicano), a través del ensayo citotóxico HCT-116 con micro dilución en caldo, y reportaron que el 19% de los extractos crudos evaluados presentaron una CI_{50} de 0.076 a 69.0 $\mu\text{g/mL}$. La caracterización de los compuestos más activos se realizó a través de espectrometría de masas, encontrándose compuestos de Monactin y derivados de Pamamicina, identificados por su peso molecular y patrones de fragmentación (Becerril-Espinosa *et al.*, 2012).

Torres-Beltrán *et al.* (2012) evaluaron el potencial antibiótico y anticancerígeno de 69 extractos crudos de actinobacterias aisladas de sedimentos colectados en Bahía Concepción y Bahía de los Ángeles (Golfo de California). Los agentes patógenos utilizados fueron *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), *Staphylococcus aureus* y la levadura *Candida albicans*. Las líneas celulares incluyeron cáncer de mama (MCF7) y cáncer cérvico-uterino (HeLa). Torres-Beltrán *et al.* (2012) reportaron la actividad antimicrobiana contra SARM de tres extractos obtenidos con metanol de cepas de los géneros raros *Micromonospora* y *Salinispora*. Los porcentajes de sobrevivencia de SARM fueron del 3% al 32%. También reportaron actividad anticancerígena contra cáncer de mama (MCF7) y cáncer cérvico-uterino (HeLa) de 15 extractos obtenidos con acetato de etilo. Los porcentajes de sobrevivencia celular fueron de 20% a 25% en la línea celular MCF7 y de 24% a 25% en la línea celular HeLa. El 58% de los extractos crudos que presentaron las actividades citotóxicas y antimicrobianas más altas pertenecieron a integrantes del género marino obligado *Salinispora* (Torres-Beltrán *et al.*, 2012).

Estos estudios han producido información y aportado al conocimiento sobre la riqueza actinobacteriana de algunas regiones costeras de México, evidenciado el potencial bioactivo de géneros como *Streptomyces*, *Salinispora* y *Micromonospora*. Sin embargo, es escasa la información del potencial bioactivo de otros géneros menos estudiados, tales como *Nocardia*, *Nocardiopsis*, *Actinomadura*, *Actinoalloteichus*, *Verrucosipora*, *Saccharomonospora*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Nonomuraea*, *Saccharopolyspora* y *Rhodococcus*.

2.2. Justificación

La búsqueda y el descubrimiento de actinobacterias marinas siguen un camino estrechamente ligado al de la búsqueda de nuevos compuestos con potencial biotecnológico y a la producción de fármacos. Estas líneas de investigación han conducido al progreso en el entendimiento y tratamiento de las enfermedades humanas alrededor del mundo. Aunque en México las investigaciones con actinobacterias marinas son escasas, estas han construido bases firmes para el desarrollo en la investigación de estos microorganismos en nuestros ecosistemas marinos.

Es necesario continuar y progresar en la investigación del potencial de los recursos microbiológicos a nuestro alcance, que incluyen a los ecosistemas marinos de nuestro país los cuales prácticamente permanecen inexplorados y los cuales, sin duda alguna, son una fuente inagotable de actinobacterias marinas raras, poco estudiadas y biológicamente activas.

Apoyado en las razones anteriores, la presente investigación se desarrolla brindando especial interés en los metabolitos secundarios producidos por actinobacterias raras que habitan en los sedimentos de algunas costas y mares de México, aspirando a generar información novedosa y conocimiento aplicado relacionado al potencial bioactivo anticancerígeno y antibacteriano de las sustancias que producen.

2.3. Objetivos

Actinobacterias raras: evaluación del potencial anticancerígeno y antibacteriano de metabolitos secundarios

Para alcanzar la meta de este estudio, se plantearon los siguientes objetivos.

2.3.1. Objetivo general

Evaluar el potencial bioactivo de sustancias producidas por actinobacterias marinas raras aisladas de sedimentos de mares y costas de México.

2.3.2. Objetivos específicos

- a) Aislar e identificar actinobacterias raras de sedimentos marinos del Golfo de California y Golfo de México.
- b) Identificar cepas actinobacterianas previamente aisladas de sedimentos costeros de Jalisco y Veracruz.
- c) Realizar una selección de actinobacterias raras para la evaluación de sus metabolitos secundarios a través de la prueba de requerimiento obligado de agua de mar.
- d) Extraer metabolitos secundarios de las cepas seleccionadas.
- e) Evaluar el efecto anticancerígeno y antibacteriano de los extractos crudos.
- f) Identificar parcialmente aquellos compuestos que puedan estar generando la bioactividad de los extractos crudos a través de un análisis de espectroscopia de masas.

2.4. Hipótesis

Con base al conocimiento adquirido de la información nacional e internacional sobre la riqueza actinobacteriana y su potencial biotecnológico, se postulan las siguientes hipótesis:

- a) Dado que los sedimentos del litoral mexicano poseen una gran riqueza microbiológica se podrá aislar e identificar actinobacterias integrantes de géneros raros y poco estudiados por medio de métodos selectivos.
- b) El potencial anticancerígeno de extractos actinobacterianos reportado en estudios realizados en México permite creer que los extractos actinobacterianos evaluados en este estudio poseerán efecto nocivo contra células de cáncer humano.

Actinobacterias raras: evaluación del potencial anticancerígeno y antibacteriano de metabolitos secundarios

c) Por el reconocido potencial antibacteriano de las sustancias químicas producidas por actinobacterias, los extractos crudos bajo estudio poseerán un efecto nocivo contra la bacteria patógena seleccionada, lo que se verá reflejado en sus CMI, que caerán dentro de alguno de los rangos de efectividad [susceptible (S), intermedio (I) y/o resistente (R)].

d) Las matrices de metabolitos secundarios de los extractos crudos bioactivos incluirán algunos de los compuestos reportados en la literatura, citotóxicos y antibacterianos, producidos por especies de los géneros actinobacterianos bajo estudio.

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA

Materiales, equipos y protocolos empleados en la investigación.

Capítulo 3 Metodología

Todos los materiales y otros elementos no desechables utilizados para el cultivo de microorganismos o manejo de sustancias químicas fueron lavados, esterilizados en autoclave (15 o 30 minutos, 121 °C y 15 lb de presión) (SM Series, Yamato), o con etanol al 70% o con hipoclorito de sodio al 10%, según fuese el caso. Todo se manipuló con la protección adecuada (bata, gafas, guantes y cubre bocas de protección) y con equipos especializados para el manejo de material químico y biológico.

3.1. Procedencia de las actinobacterias

Se seleccionaron sedimentos marinos como entorno de procedencia de las cepas actinobacterianas debido al valioso papel que desempeñan estos ambientes como fuente inagotable y casi inexplorada de actinobacterias (Stach y Bull, 2005; Stach *et al.*, 2003; Gontang *et al.*, 2007). Para dicho fin fueron facilitadas un total de 12 muestras de sedimentos marinos (costeros y profundos) colectadas en dos investigaciones previas en el Golfo de California (2008 y 2011) y el Golfo de México (2011) (Anexo 1, A3). Las muestras del Golfo de California fueron proporcionadas por la Dra. Irma Soria Mercado y las del Golfo de México por el Dr. Alexei F. Licea Navarro, investigador del Laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas del CICESE, en colaboración con la Dra. Irma E. Soria Mercado.

Las muestras de profundidades mayores a 20 m fueron colectadas empleando una draga Van Veen de acero inoxidable de 12 cm de longitud (Kahlsico Int. Corp.). Las muestras de 2 a 15 m de profundidad se colectaron por buceo libre. Todo el material utilizado para tomar las muestras fue esterilizado con etanol al 100%. Inmediatamente después de sacar la draga, la muestra se colectó de los primeros 2 cm de la capa de sedimento empleando una espátula de metal para transferirla a bolsas estériles, etiquetada previamente y conservadas a 4 °C hasta su posterior análisis (Becerril-Espinosa, 2011).

3.2. Pretratamiento de sedimentos marinos

Se han reportado muchos pretratamientos físicos en muestras de hábitats naturales, como los sedimentos marinos, esponjas, algas, etc. (Hames-Kocabas y Uzel, 2012). Algunos de estos métodos involucran secado y calentamiento de las muestras para estimular el aislamiento de actinobacterias raras (Kim *et al.*, 1995). En base a estas consideraciones se seleccionó el método de secado sin calor de las muestras de sedimentos (Nolan y Cross, 1988). Este método consiste en colocar en una campana de flujo laminar de 1 a 5 gramos de cada muestra de sedimento húmedo en una caja petri estéril durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se examinan las muestras en busca de formación de grumos y, si se presentan, se maceran en un mortero previamente esterilizado con alcohol al 70%.

3.3. Métodos de aislamiento y de estampado en placa.

Para llevar a cabo el aislamiento de actinobacterias raras se prepararon seis medios de cultivo diferentes (Tabla 3.1). Estos métodos de aislación han sido reportados en diversos estudios enfocados en el desarrollo y aplicación de técnicas específicas para el aislamiento de actinobacterias raras (Ensign, 1978; Mincer *et al.* 2002; Gontang *et al.* 2007).

Todos los medios de cultivo (líquidos y sólidos) se prepararon con agua de mar natural (filtrada e irradiada con luz ultravioleta) complementada con antibióticos. Para estimular el crecimiento de actinobacterias raras se emplea Gentamicina (40 mg/mL, Sigma-Aldrich Corp., EU), mientras que para inhibir el crecimiento de hongos se emplea Cicloheximida (100 µg/mL, Sigma-Aldrich Corp., EU) y, finalmente, Rifampicina (0.5 mg/mL, Sigma-Aldrich Corp., EU) para inhibir el desarrollo de bacterias de crecimiento rápido (Williams y Wellington 1982; Yu *et al.* 2013; Bian *et al.*, 2009)

Tabla 3.1 Métodos de aislamiento que muestran los componentes de los seis medios sólidos de cultivos seleccionados para el aislamiento de actinobacterias raras, y componentes del medio de cultivo para las cepas puras.

Método	Componentes (cantidad en g/L)
M1	Agar (18)

Actinobacterias raras: evaluación del potencial anticancerígeno y antibacteriano de metabolitos secundarios

M2	Agar (18), manitol (0.5), peptona (0.1)
M3	Agar (18), almidón (1), peptona (0.2)
M4	Agar (18), manitol (2.5), peptona (1)
M5	Agar (18), manitol (0.5), casaminoácidos (0.1)
M6	Agar (18), triptona (0.6), casitona (1), glucosa (0.8)
A1*	Agar (14), almidón (10), peptona (2), levadura (4)

Ensign 1978; Mincer *et al.* 2002; Jensen *et al.*, 2002; Gontang *et al.* 2007, y Subramani y Albersberg, 2013.

* Medio para el cultivo de cepas puras, sin antibióticos.

Posteriormente, se presiona sobre la muestra de sedimento seco un tapón de espuma estéril de 2 cm de diámetro hasta cubrir una de sus superficies. El tapón se presiona varias veces sobre la superficie de la placa de agar en una misma dirección creando un efecto de dilución en serie (Figura 3.1; Mincer *et al.*, 2002; Jensen *et al.*, 2005; Gontang *et al.*, 2007). Cada muestra de sedimento se estampó por triplicado en los seis diferentes medios de sólidos.

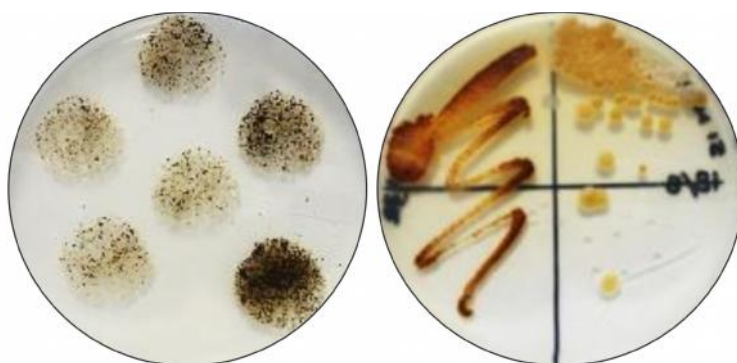


Figura 3.1. Método en dilución de estampado de sedimento marino y purificación preliminar de actinobacterias.

Las placas estampadas se colocan en incubación a 28 °C durante cuatro semanas, periodo durante el cual se debe realizar el monitoreo de cada placa con un microscopio (Nikon 89127, Japón) en busca de colonias actinobacterianas bien definidas. Las colonias de actinobacterias se reconocen por la presencia del micelio sustrato y micelio aéreo, la presencia de hifas filamentosas y/o esporas, y

Actinobacterias raras: evaluación del potencial anticancerígeno y antibacteriano de metabolitos secundarios

por la formación de colonias duras y rígidas adheridas y/o enterradas en la superficie del agar (Goodfellow y Williams, 1983). Cada colonia bacteriana que cumpla con estas características debe de ser removida de la placa de estampado y subcultivada para una purificación preliminar (Figura 3.1) en placas nuevas de medio A1 preparado con 100% agua de mar (Jensen *et al.*, 2005). Al cabo de siete días se verifica la pureza de los subcultivos y se transfirieron individualmente a una placa nueva de medio A1 preparado con 75% agua de mar y 25% de agua destilada (A1-75%). Al menos tres resiembras fueron necesarias hasta lograr la purificación de las cepas al 100%. Una vez puras, se realizó la descripción morfológica colonial de cada una.

3.4. Preservación criogénica

La preservación criogénica permite la generación y mantenimiento de cepas bacterianas y decrece la necesidad de repetir subcultivos, los cuales pueden conducir a la contaminación, deriva genética y mutación cuando porciones pequeñas de la población bacteriana son continuamente seleccionadas (Mincer *et al.*, 2002). La conservación a baja temperatura reduce la deriva fenotípica y genética y ayuda a asegurar la reproducibilidad de resultados al utilizar una cepa consistente (Simione, 2006). Debido a estas razones se empleó un agente crioprotector (glicerol) para preservar todas las cepas puras que consistió en la inoculación de cada cepa en 25 mL de medio de cultivo líquido en matraces Erlenmeyer de 125 mL encapuchados con tela de algodón y papel bioescudo resistente a esterilización (Convertor Bio-shield Sterilization Wraps, Cardinal Health, EU.). Las cepas se incuban de cuatro a siete días a 28 °C en agitación continua a 160 rpm. Tiempo transcurrido se les agrega el glicerol estéril (grado analítico, Thermo Fisher Scientific Inc., EU.) para llegar a una concentración final de glicerol en el medio del 10% (ATCC, 1991). Finalmente se transfiere 1.0 mL de la mezcla a un tubo de criopreservación estéril, se etiqueta, se mete a refrigeración a 4 °C por 20 minutos y enseguida se almacena en el cepario a -80 °C.

3.5. Análisis filogenético del gen 16s ARN ribosomal

Se identificaron todas las actinobacterias que se lograron aislar de las 12 muestras de sedimento del Golfo de California y Golfo de México.

Alrededor de 66 cepas de actinobacterias previamente aisladas de sedimentos costeros con las mismas técnicas empleadas en este estudio fueron facilitadas para su investigación por la M. en C. Natalie Millán Aguiñaga del Centro de Biotecnología Marina y Biomedicina (CMBB, por sus siglas en inglés) de Scripps, San Diego (California, EU.). La procedencia de estas cepas son muestras de sedimentos recolectados en las costas de Veracruz y Puerto Vallarta, Jalisco, durante el año 2011 (Anexo 1, A3). Esto incrementó la posibilidad de encontrar

géneros raros de actinobacterias con potencial biotecnológico. De las 66 cepas, 21 cepas habían sido previamente identificadas con las técnicas descritas a continuación. Las 45 cepas restantes fueron identificadas durante este estudio.

3.5.1. Extracción de ácidos nucleicos, amplificación del gen y secuenciación

Para la extracción de ácidos nucleicos inicialmente se cultivó cada cepa en medio líquido A1-75%. Con un palillo de madera estéril se tomaron varias colonias de una placa y se inocularon en 25 mL de medio estéril que se incubó a 28 °C por cuatro días con agitación continua a 110 rpm. Al cuarto día se transfirió 1 mL con biomasa apreciable a tubos estériles Eppendorf de 2.5 mL los cuales se centrifugaron (5 min a 8000 rpm), descartándose el medio al final. Los tubos con el gránulo celular se conservaron a -20 °C de 7 a 10 días hasta la posterior extracción del ADN genómico. Posteriormente se descongeló cada muestra a temperatura ambiente y se llevó a cabo la extracción de ADN de acuerdo al protocolo DNeasy (Qiagen Inc., EU.), con las modificaciones sugeridas por Gontang *et al.* (2010) que consisten en que el ADN genómico se recupera de la columna con 50 µL de buffer AE para utilizarlo inmediatamente o es conservado a -20 °C hasta su posterior uso. Previo a la amplificación del gen de interés, se verifica la pureza del ADN con un espectrofotómetro de nano gotas marca Nanodrop^{MR}, modelo ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., EU.). Se trabajó con muestras que contenían de 10 a 100 ng de ADN. Posteriormente estas muestras fueron utilizadas para amplificar el gen 16s ARNr a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Se utiliza una mezcla de reacción de 25 µL volumen total, con 0.5 µL de los cebadores bacterianos FC27 (5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3) y RC1492 (5-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3) a una concentración de 10 µM, 1 µL de una mezcla de desoxinucleósido trifosfato (dNTP 10 mM, Promega, EU.), 0.25 µL de polimerasa Taq AmpliTaq Gold (Roche Molecular Systems, Inc., EU.), 2.5 µL MgCl₂, 10% PCR buffer (2.5 µL), y 5% dimetil sulfóxido (1.25 µL). La reacción se llevó a cabo en un termociclador iCycler® (BIO-RAD^{MR} Laboratories Inc., EU.) con

un paso inicial de desnaturalización (94 °C por 10 min) seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, hibridación del cebador a 63 °C por 1 min y extensión del cebador a 72 °C por 1 min, y una extensión final a 72 °C por 7 min. Los amplicones (fragmentos formados de ADN) fueron separados en un gel de electroforesis de agarosa (10 g/L) en buffer TAE 1x (Prime^{MR}, Hilden, Alemania), marcados con SYBR green (Roche Molecular Systems, Inc., EU.) y visualizados bajo un sistema documentador de geles de trasiluminación UV (U: Genius3, Syngene, EU.).

Previo a la secuenciación, los productos del PCR fueron purificados de acuerdo al protocolo del DCCMR (DNA Clean & Concentrator MR-5, Zymo Research, EU). La secuenciación de las muestras se llevó a cabo por la compañía SeqXcel Inc. (San Diego, CA, EU.) con un analizador genético de electroforesis capilar ABI Prism® (Applied Biosystems, EU.) y de acuerdo al protocolo del BigDye® Terminator chemistry kit (Applied Biosystems, EU.).

Las secuencias parciales del gen 16S ARNr fueron alineadas utilizando el programa Geneious^{MR} R7 versión 7.0.6 (Kearse *et al.*, 2012) y comparadas utilizando el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en las bases de datos de secuencias del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Se relacionó cada cepa con el organismo más similar.

Asimismo, para emparentar las actinobacterias identificadas con aquellas actinobacterias filogenéticamente más similares, se elaboró un árbol filogenético (Anexo 1). Se utilizaron las secuencias alineadas con Geneious^{MR} R7 y las secuencias de las cepas de referencia adquiridas de EzBiocloud^{MR} (<http://www.ezbiocloud.net/>) (Chunlab, Inc. EU.). El árbol se construyó con el software Mega6^{MR} (<http://www.megasoftware.net>) (Tamura *et al.*, 2013).

3.6. Selección de actinobacterias raras para la extracción y evaluación de metabolitos secundarios.

3.6.1. Requerimiento obligado de condiciones salinas para crecer.

Actualmente son poco estudiados los géneros o especies que poseen un requerimiento obligado de condiciones salinas. Estos organismos son conocidos como marinos obligados (Mincer *et al.*, 2002, 2005, Pimentel-Elardo *et al.*, 2008, Yuan *et al.*, 2014). Algunas especies de estos géneros se desarrollan exclusivamente en un medio con concentraciones de sales <5%. Como referencia, el agua de mar posee en promedio alrededor de 3 a 3.5%. Los géneros integrados por actinobacterias con estas adaptaciones son considerados géneros raros (Subramani y Aalbersberg, 2013).

Con base en lo anterior, se aplicó una prueba para identificar si las cepas de actinobacterias bajo estudio poseen un requerimiento obligado de condiciones salinas (ROCS) con el fin de seleccionar aquellas cepas raras candidatas para la extracción y evaluación de sus metabolitos secundarios.

La prueba se lleva a cabo inoculando cada cepa por triplicado en placas de medio sólido A1 preparado solo con agua destilada (A1-0%) y en placas con medio A1-75%. Las placas se incuban a 28 °C durante cuatro semanas y el crecimiento se monitorea con un microscopio (Nikon 89127, Japón). Si no se observa crecimiento en las placas con medio A1-0% (ROCS positivo), la cepa se considera marina obligada. Las cepas que obtuvieron resultados positivos fueron seleccionadas para los análisis posteriores.

3.7. Extracción de metabolitos secundarios

Para la extracción de los metabolitos secundarios se emplearon dos técnicas de extracción con solventes orgánicos, utilizando metanol (MeOH, polaridad alta) y acetato de etilo (AcOEt, polaridad media). El objetivo fue extraer compuestos de distintas polaridades para incrementar la variedad de los metabolitos secundarios.

Inicialmente, las cepas seleccionadas se pre-cultivan en 25 mL de medio líquido A1-75% y se incuban a 28 °C con agitación continua a 160 rpm. Al séptimo día se transfieren alícuotas (5% v/v) con pipetas serológicas estériles a matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio A1-75%. Todos los cultivos se

Actinobacterias raras: evaluación del potencial anticancerígeno y antibacteriano de metabolitos secundarios

incuban nuevamente a 28 °C con agitación continua (160 rpm) durante seis días. Al sexto día de crecimiento a cada cultivo se le agregan 2 g de resina polimérica de extracción (activada con metanol y agua destilada) Amberlite® XAD7 HP (20 g/L) (Sigma-Aldrich Corp., EU.) y se agita durante 2 horas. Las células y la resina se transfieren con pipetas serológicas a tubos de centrifuga de 50 mL y se centrifugan a 4000 rpm por 5-10 min. El medio se vierte por decantación a un matraz Erlenmeyer limpio y se conserva para la posterior extracción con AcOEt (en las horas posteriores). Todas las muestras se lavan con agua destilada de tres a cinco veces hasta obtener claridad en los lavados (para eliminar la mayor cantidad de las sales del medio). Se decanta el agua de los lavados y las muestras se congelan a -80 °C para posteriormente llevarlas a sequedad (de 24 a 48 horas) en un liofilizador (Sentry^{MR} 2.0, Sp. Industries Inc., EU., y/o FreeZone 2.5 Labconco®, EU.). Una vez secas, las muestras se conservan congeladas a -20 °C hasta su posterior extracción con MeOH.

Para la extracción con MeOH se emplea la muestra seca que se transfiere a matraces Erlenmeyer de 250 mL al cual se le agregan 20 mL de MeOH (grado analítico, Thermo Fisher Scientific Inc., EU.). Se mezcla y se agita la muestra durante dos horas y posteriormente se filtra cada una a través de papel filtro de 45 µm de tamaño de poro (Fisher Scientific Inc, EU.). Las muestras son concentradas por rotaevaporación al vacío (Hei-VAP Value "The Collegiate", Heidolp, EU.) a una presión de 25 pulgadas de Hg y una temperatura de 35 °C. Si en la resina perdura la coloración, se repite la extracción para poder recuperar la mayor cantidad de metabolitos secundarios adsorbidos.

Cada extracto concentrado se pasa a través de filtros de jeringa Puradisc® (25 mm diámetro, 2.0 µm tamaño de poro, membrana PTFE, Whatman® Inc., EU.) y se recupera en viales de centelleo de 25 mL (previamente pesados). El resto del solvente se seca nuevamente por aireación o rotoevaporación y, finalmente, se registra el peso neto de cada extracto crudo.

Para la extracción con AcOEt se emplea la extracción líquido-líquido mezclando el medio líquido conservado en la extracción anterior con 50 mL de AcOEt (grado analítico, Thermo Fisher Scientific Inc., EU.). La mezcla se agita

durante dos horas al final de las cuales cada muestra se vierte en un embudo de separación de 250 mL y se deja en reposo de 10 a 20 minutos para la separación de la fase orgánica de la fase acuosa. La fase orgánica se recupera en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, filtrando la fase recuperada a través de papel filtro de 45 µm de tamaño de poro (Fisher Scientific Inc, EU.). Esta fase orgánica se concentra mediante rotoevaporación al vacío (Hei-VAP Value "The Collegiate", Heidolp, EU.) a una presión de 20 pulgadas de Hg y una temperatura de 25 °C. Cada extracto concentrado se pasa a través de filtros de jeringa Puradisc® (25 mm diámetro, 2.0 µm de tamaño de poro, membrana PTFE, Whatman® Inc., EU.) y se recupera en viales de centelleo de 25 mL (previamente pesados). El resto del solvente se seca nuevamente por aireación o rotoevaporación y finalmente se registra el peso neto de cada extracto crudo.

Dos muestras del medio de cultivo A1-75% sin células fueron sometidas a los dos procedimientos de extracción anteriormente descritos para obtener un blanco de medio A1-75% de AcOEt (medio AcOEt) y otro de MeOH (medio MeOH). Estos blancos se preparan y conservan para los procedimientos posteriores.

3.8. Evaluación del potencial activo de metabolitos secundarios

Para llevar a cabo los bioensayos que a continuación se describen, cada extracto crudo de MeOH y AcOEt se preparó en solución con una concentración final de 10 mg/mL en DMSO (grado analítico, Thermo Fisher Scientific Inc., EU). Estos bioensayos se realizaron en el Centro de Biotecnología Marina y Biomedicina de Scripps.

3.8.1. Actividad anticancerígena

Se evaluó el efecto anticancerígeno de los extractos crudos sobre la línea celular de carcinoma colorrectal HCT-116 a través del ensayo citotóxico *in vitro* de reducción de la sal MTS tetrazolio (Ensayo MTS), por el método de micro dilución de caldo (CLSI, 2006). En este método las células cancerosas se cultivan en

medio RPMI (HyClone RPMI 1640, Thermo Scientific, EU.), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (Corning, Inc., EU.), solución tampón Hepes 1 M (Sigma-Aldrich Corp., EU) y solución de penicilina (10,000 U/mL)-estreptomicina (10 mg/mL)-anfotericina B (25 µg) (Sigma-Aldrich Corp., EU). Los cultivos se incuban a 37 °C con 5% de CO₂ (Incubadora Forma™ 310 Direct Heat Thermo Scientific, EU.).

El ensayo de citotoxicidad *in vitro* se lleva a cabo incubando las células con los extractos crudos durante 24 horas en microplacas de 96 pocillos (Thermo Scientific Inc., EU.). Se utiliza como control positivo el estándar anticancerígeno Etoposide VP-16 (Sigma-Aldrich Corp., EU.), como control negativo se utiliza DMSO, como blanco se utiliza el medio de cultivo RPMI y los medios de cultivo A1-75% de MeOH y AcOEt.

Para determinar el número de células viables tras la incubación, se utiliza un indicador del metabolismo celular activo, el cual se prepara con sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio (MTS, Promega, EU.) y metosulfato de fenazina (MSF, Sigma-Aldrich Corp., EU) a una concentración final de 0.92 mg/mL y 2.0 mg/mL, respectivamente, en solución salina amortiguada con fosfatos de Dulbecco sin MgCl₂ y CaCl₂ (SSTD, Sigma-Aldrich Corp., EU). A cada pocillo se le agregan 20 µL del indicador, se incuban las microplacas durante 3 horas y finalmente se miden las densidades ópticas.

Lo que ocurre durante el tiempo de incubación es la bio-reducción de la sal MTS tetrazolio a sal formazán (compuesto de color azul soluble en medio de cultivo celular) llevada a cabo por las células cancerosas. Se presupone que la cantidad de células vivas metabólicamente activas es proporcional a la cantidad de formazán producido, en caso contrario, si las células comienzan a morir la coloración cambia de azul a claro, pues la actividad metabólica no da lugar a la producción de sal formazán.

El formazán se mide en densidades ópticas en un espectrofotómetro de microplacas (Multiskan® FC, Thermo Scientific® Inc, EU.) a 490 nm. Finalmente, se calcula la concentración inhibitoria máxima media CI₅₀, que representa la concentración de un compuesto necesaria para una inhibición celular del 50% *in*

vitro. Las muestras que inhiben el 90% o más se consideran con un potencial bioactivo importante.

3.8.2. Actividad antibacteriana

Se evaluó el efecto antibacteriano de los extractos crudos contra la bacteria patógena *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) capaz de provocar infecciones potencialmente letales. Para esto se empleó la prueba de susceptibilidad concentración mínima inhibitoria (CMI) a través del método de microdilución de caldo (Cavalieri *et al.*, 2005; CLSI, 2006). Para el cultivo de la SARM se inocula 1 mL de la cepa bacteriana CNJ279 en un tubo estéril de 50 mL con 10 mL (dilución 1:10) de medio GYT (1 L de agua destilada, 2.5 g de levadura, 5 g de triptona y 1 g de glucosa), se incuba a 37 °C con agitación continua durante una noche. Al día siguiente se prepara una dilución 1:50 del cultivo en un nuevo tubo de 15 mL (0.4 mL de la dilución 1:10 y 10 mL medio GYT), se toman 100 µL en una microcelda para medir las densidades ópticas (DO) a 600 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf®, Al.), utilizando como blanco el medio GYT.

Se trabajó con densidades ópticas entre 0.04 y 0.06, si se obtienen una DO < 0.04 o > 0.06 se agregan más células o más medio, según sea el caso. Asimismo, para verificar la pureza del cultivo, se prepara un control de pureza, inoculando 20 µL de la solución 1:50 de SARM en una placa con agar de medio GYT (Welgene, Inc. EU.) y se incuba por 24 horas a 37 °C. Posteriormente, se prepara una dilución final 1:10 y se determina la cantidad necesaria de suspensión celular según el número de muestras. Por ejemplo, para 10 muestras, en un tubo nuevo de 50 mL se mezclan 2 mL de la suspensión celular 1:50 (previamente verificada con el control de pureza) con 20 mL de medio GYT. De esta suspensión celular final se colocan inóculos de 195 µL, en microplacas de 96 pocillos (Thermo Scientific Inc, EU.) mezclados con 5 µL de cada extracto crudo (solo en la primer fila de pozos), se realizan 7 diluciones seriales (1/4) verticalmente, con un volumen final de 100 µL y se incuban las placas a 37 °C (Incubadora Shel Lab SMI6, EU.) durante 24 horas.

Como control positivo se utilizó el estándar antibiótico Vancomicina (Hospira, Inc., EU.), el cual posee una CMI de 2 µg/ml contra el SARM (Haste *et al.*, 2010). Como control negativo se utiliza DMSO (grado analítico, Thermo Fisher Scientific Inc., EU.) y como blanco se utiliza el medio de cultivo bacteriano GYT y los medios de cultivo A1-75% de MeOH y AcOEt. Finalmente, trascurrido el tiempo de incubación se realiza la lectura de las DOs a 600 nm y se calcula la CMI.

3.9. Identificación preliminar de compuestos bioactivos

A través del análisis de cromatografía líquida y espectrometría de masas (CL-EM) se realizó la búsqueda e identificación parcial de los compuestos bioactivos presentes en los extractos crudos de aquellos géneros raros de actinobacterias que presentaron la más alta bioactividad en los bioensayos empleados y de los cuales no ha sido reportado su potencial bioactivo en estudios nacionales. Lo anterior con el fin de realzar la importancia de géneros marinos obligados no reportados previamente en México.

3.9.1. Análisis CL-EM

Los análisis de CL-EM se realizaron en el Centro de Biotecnología Marina y Biomedicina de Scripps con un cromatógrafo de líquidos (CL) Agilent 1260 con detector de matriz de yoduros acoplado a un espectrómetro de masas (EM) Agilent 6530 equipado con un analizador de cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF por sus siglas en inglés) y una fuente de ionización por electrospray (ESI, por sus siglas en inglés).

Cada extracto crudo fue filtrado a través de filtros de jeringa Acrodisc PTFE (Pall Inc., EU.) ajustados a una concentración de 1 mg/mL con MeOH en viales de 1.8 mL con injertos (9-425 PTFE, VWR®, EU). Se inyectaron al CL-EM 20 µL de cada extracto y los espectros fueron generados en modo positivo con escaneos de 100 a 1700 unidades de masa/carga (m/z). Los resultados espectrales fueron analizados con el software Mass++ 2.7.2 (Tanaka, *et al.*, 2014). Se buscaron e identificaron los fragmentos de iones moleculares reportados en la literatura que

Actinobacterias raras: evaluación del potencial anticancerígeno y antibacteriano de metabolitos secundarios

se encontraban relacionados con los compuestos bioactivos producidos por algunas especies de los géneros de actinobacterias bajo estudio.

3.10. Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico básico (cálculos porcentuales, media, mínimos y máximos) de los resultados obtenidos.

3.11. Nota aclaratoria

Los bioensayos y los análisis de espectrometría de masas fueron realizados por técnicos especializados en el Centro de Biotecnología Marina y Biomedicina (CMBB) de Scripps.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Alcance de los objetivos planteados

Capítulo 4 Resultados y discusión

4.1. Actinobacterias aisladas e identificadas.

Se logró el aislamiento y purificación de 18 cepas de actinobacterias de las muestras de sedimento del Golfo de California y Golfo de México (Tabla 3, Anexo 1, A1). Los resultados de la identificación filogenética permitieron relacionar a todas las cepas (82 cepas) con 13 géneros diferentes, 10 de ellos reportados como géneros raros (Subramani y Albersberg, 2013). Cada cepa recibió un nombre en código de acuerdo al sitio de origen, un número consecutivo y la letra inicial del color característico de la cepa. Se elaboró un catálogo fotográfico-descriptivo de un integrante de cada género identificado (Capítulo 6).

Tabla 4.1. Géneros relacionados con las 82 cepas analizadas en el estudio. Número total de cepas por género y sitio de origen.

Género	No. total de cepas	Sitio de origen			
		GC	GM	PV	V
<i>Actinoalloteichus</i>	5	-	-	3	2
<i>Actinomadura</i>	4	-	1	2	1
<i>Actinophytocola</i>	1	-	1	-	-
<i>Astrosporangium</i>	1	-	1	-	-
<i>Micromonospora</i>	32	-	7	5	20
<i>Nocardiosis</i>	5	-	1	2	2
<i>Nonomuraea</i>	3	-	3	-	-
<i>Rhodococcus</i>	1	-	-	-	1
<i>Saccharomonospora</i>	1	-	-	-	1
<i>Salinispora</i>	19	-	-	18	1
<i>Streptomyces</i>	6	2	2	2	-
<i>Streptosporangium</i>	1	-	-	-	1
<i>Verrucosispora</i>	3	-	-	1	2

GC: Golfo de California GM: Golfo de México
PV: Puerto Vallarta V: Veracruz

Sin duda alguna, uno de los factores que contribuyó al aislamiento de estas actinobacterias vinculadas a géneros raros fueron los métodos de aislamiento empleados en el estudio. El método más efectivo fue el M5 (Tabla 3.1) ya que con este medio de cultivo se logró aislar el 59% del total de actinobacterias, seguido

del 32% logrado con el medio M3 y, por último, el 10% con el medio M2. Con los otros métodos (M1, M4, y M6) no se logró aislar ninguna cepa.

El componente clave del método M5, al cual le atribuimos el desarrollo favorable de estas cepas raras, son los casaminoácidos, constituidos por una mezcla de aminoácidos producto de la hidrólisis ácida de la caseína. La caseína es empleada por otros investigadores con resultados favorables para el aislamiento de actinobacterias raras (Hayakawa y Nonomura, 1987a; 1987b; Cho *et al.*, 1994). En el caso de los medios M3 y M2, ambos incluyeron peptona, considerada como fuente principal de nitrógeno en el cultivo de bacterias comunes y raras (Pimentel-Elardo *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012 y Li *et al.*, 2012). Otros factores importantes que también favorecieron al aislamiento e identificación de actinobacterias raras fue la riqueza microbiológica que México posee y la elección de los sedimentos marinos como el entorno de procedencia de las actinobacterias. Estas bacterias son consideradas una de las fuentes más accesibles y ricas en diversidad actinobacteriana (Abdelmohsen *et al.*, 2014).

Con estos resultados logramos alcanzar el primer objetivo específico de este trabajo, así como la aprobación de una de las hipótesis establecidas (Hipótesis: Inciso a).

4.2. Características morfológicas generales de actinobacterias raras

Existen otros criterios para identificar actinobacterias raras basados en sus rasgos morfológicos. En este caso, aquellas cepas que no poseen características morfológicas del género *Streptomyces* sobresalen entre éste y otros géneros más estudiados (Baltz, 2006).

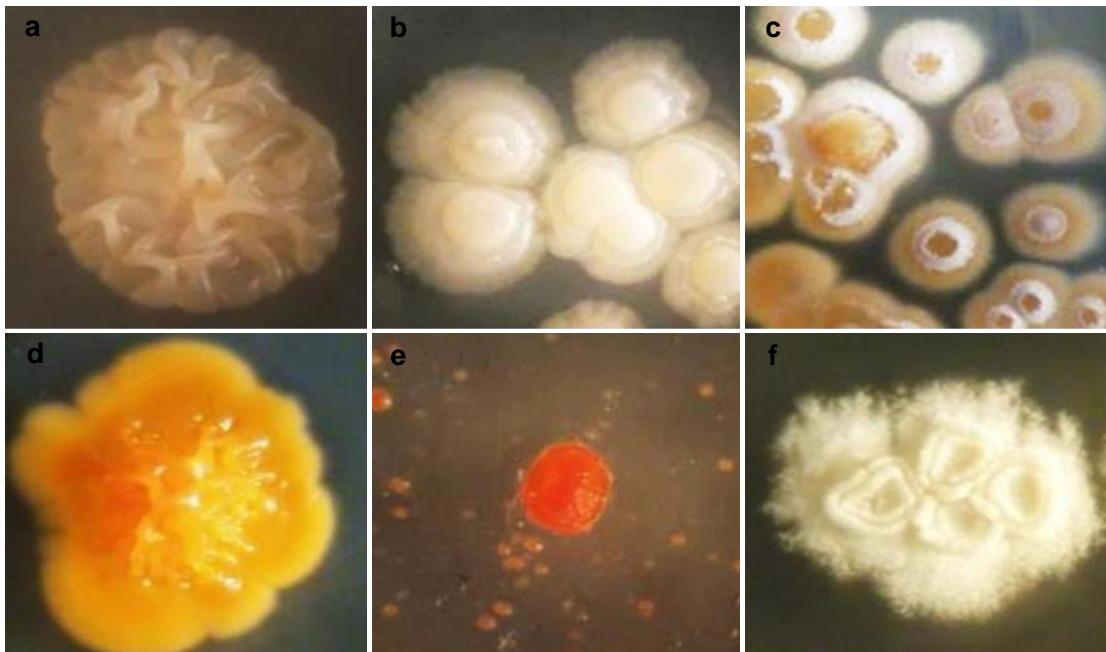


Figura 4.1. Algunos morfotipos de actinobacterias aisladas de sedimentos del Golfo de California y Golfo de México: a) *Nocardiosis sp* (30x), b) *Actinomadura sp* (20x), c) *Nonomuraea sp* (20x), d) *Micromonospora sp* (30x), e) *Astrosporangium sp* (30x), y f) *Actinophytocola sp* (20x).

Desde este punto de vista, la morfología colonial que se observó en la mayoría de las cepas cumplió con lo establecido por Baltz (2006), pues se identificaron diversas formas y superficies coloniales, con micelios aéreos prominentes y diversas coloraciones (Figura 4.1). Para poder establecer los rasgos fisiológicos que diferencian las cepas raras de las cepas tipo-*Streptomyces*, acudimos a la descripción morfológica de representantes de la familia *Streptomycetaceae* (Anderson y Wellington, 2001; Bredholt *et al.* 2007). Básicamente, las actinobacterias tipo-*Streptomyces* se caracterizan por la formación de colonias convexas (muy prominentes) con hifas desarrolladas y micelio aéreo filamentoso, con esporas de color gris, blanco, blanco/amarillo y blanco/morado, además de una textura aterciopelada (tipo talco). De lo contrario, las cepas que no presentan estos rasgos pueden exhibir coloraciones translúcidas u opacas (Figura 4.1. a y b) muy variadas, con tonos rojos, rosas, naranjas (Figura 4.1. e), amarillos (Figura 4.1. d), marrones, azules, así como formas coloniales con

superficies lisas, rugosas (Figura 4.1. a), suaves o rígidas, con micelio aéreo poco prominente, abarcando una variedad de morfotipos característicos de las actinobacterias raras. En el capítulo seis se describen los rasgos fisiológicos con mayor detalle de algunas de estas cepas identificadas en el estudio.

4.3. Actinobacterias raras: cepas marinas obligadas

Los resultados de la prueba del requerimiento obligado de agua de mar comprobaron que 28 cepas aisladas de sedimentos colectados en Puerto Vallarta (PV) y Veracruz (V) son marinas obligadas (Tabla 4.2) ya que su crecimiento estuvo exclusivamente limitado a las tres placas con medio A1-75%, evidenciando con este rasgo una característica que las distingue del resto.

Estas cepas fueron consideradas actinobacterias raras y la mayoría de ellas seleccionadas para la extracción de metabolitos secundarios y evaluación de su bioactividad. Las 28 cepas abarcaron seis géneros diferentes, el más representativo fue el género *Salinispora*, seguido del género *Actinoalloteichus* y *Nocardiopsis* y, finalmente, los géneros *Micromonospora*, *Streptomyces* y *Saccharomonospora*.

Tabla 4.2. Cepas de actinobacterias marinas obligadas por género.

Género	Cepas
<i>Salinispora</i>	PV-5n, 6n, 7n, 8n, 9n, 12n, 13n, 14n, 15n, 16n, 17n, 18n, 19n, 20n, 21n, 22n, 23n, 24n.
<i>Actinoalloteichus</i>	PV-1b, 3b, 4b; V-1b
<i>Nocardiopsis</i>	PV-10b, V-3b, 4b.
<i>Micromonospora</i>	PV-11n
<i>Streptomyces</i>	PV-2b
<i>Saccharomonospora</i>	V-2b

El género *Salinispora* fue el primero en ser reportado como marino obligado por Mincer *et al.* (2002). Actualmente no se ha registrado ninguna especie de este género en el medio terrestre, por lo que se le considera un género marino autóctono. Gracias al potencial bioactivo del género *Salinispora* descrito previamente en la literatura científica (Maldonado *et al.*, 2005; Jensen *et al.*,

2005a; Subramani y Aalbersberg 2012) y a las investigaciones realizadas en México (Becerril-Espinosa *et al.*, 2011; Torres-Beltrán *et al.*, 2012), es probable que se registre bioactividad anticancerígena y antimicrobiana de los extractos preparados de cepas de este género.

El género *Actinoalloteichus* está integrado por algunas especies que poseen la capacidad de desarrollarse en un medio con altas concentraciones de sal (halófilas). Estas especies son buscadas alrededor del mundo con el fin de aislar compuestos nuevos y bioactivos de las sustancias que producen (Cai, 2009). Sus adaptaciones fisiológicas las sitúan entre los organismos menos estudiados del *phylum Actinobacteria* (Subramani y Albersberg, 2013). En este trabajo identificamos cuatro cepas de este género con rasgos marinos obligados nunca antes reportados en costas y mares de México. Los extractos crudos de estas cepas podrían poseer bioactividades interesantes, como se ha observado en otras especies de este género (Boudjelal *et al.*, 2011a).

El género *Nocardiopsis*, representado en este trabajo por tres cepas marinas obligadas, es uno de los géneros menos estudiado y se encuentra integrado por algunas especies halófilas (Kroppenstedt, 1992; Yassin *et al.*, 1993, Al-Tai y Ruan, 1994; Yassin *et al.*, 1997). Actualmente se siguen descubriendo más especies de este género con rasgos y propiedades bioactivas, aisladas de sedimentos marinos, esponjas, macroalgas y corales (Bredholdt *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009; Engelhardt *et al.*, 2010; Meklat *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013). Estas tres cepas son el primer registro de especies del género *Nocardiopsis* con rasgos marinos obligados aisladas de sedimentos marinos de México.

El género *Micromonospora*, considerado uno de los géneros de actinomicetos raros y fuentes prolíficas de metabolitos secundarios novedosos (Subramani y Albersberg, 2013) fue representado en este trabajo por una cepa que mostró rasgos marinos obligados (Cepa PV-11n). Este género está integrado por diversas especies con potencial bioactivo (Lam, 2006; Zhang *et al.*, 2012; Tian

et al., 2013), algunas tolerantes a diversas concentraciones de sales (~7%) (Tanasupawat *et al.*, 2010). Sin embargo, la cepa aislada en este trabajo representa el primer registro de cepas marinas obligadas de este género aisladas de sedimentos marinos de México.

El género *Streptomyces*, reconocido por ser un excelente productor de antibióticos (Berdy, 2005) y cuyos metabolitos secundarios poseen actividad antimicrobiana (Tian *et al.*, 2012), estuvo representado en este trabajo por la cepa marina obligada PV-2b (Tabla 4.2). Recientemente se describió por primera vez una especie de este género con una adaptación marina obligada, la especie *Streptomyces oceani sp. Nov.*, aislada de nódulos de carbonato profundos colectados al sur del mar de China y que solo puede desarrollarse en medio con concentraciones de sal de 2.5 a 12.5%. Así mismo, otras especies raras han sido reportadas con adaptaciones fisiológicas muy específicas. Por ejemplo, se describió la especie *Streptomyces synnematoformans sp. Nov.* como un organismo neutrofílico que puede desarrollarse exclusivamente en un medio con pH neutro (pH=7). Esta especie fue aislada de sedimentos de dunas de Egipto (Hozzein y Goodfellow, 2007) y en un recuento realizado por Subramani y Albersberg (2013) se expone que desde 1974 hasta el 2005 alrededor de 6,550 antibióticos se descubrieron en especies de este género (Tabla 1.1.). A pesar de que es el género más estudiado, aún se siguen descubriendo especies raras y gracias a investigaciones llevadas a cabo, el aislamiento de metabolitos secundarios bioactivos y de antibióticos sigue en constante aumento. Todos estos antecedentes nos permiten proyectar que la cepa marina obligada PV-2b del género *Streptomyces* pueda registrar bioactividades con posibles aplicaciones importantes en nuestra evaluación contra células de cáncer y MRSA. Por otra parte, es el primer registro en México de una cepa marina obligada del género *Streptomyces*.

El género *Saccharomonospora*, representado en este estudio por la cepa marina obligada V-2b (Tabla 4.2), es un género integrado por especies con potencial bioactivo que poseen adaptaciones fisiológicas tales como tolerancia a

medios con altas concentraciones de sal (Meklat *et al.*, 2011; Boudjelal *et al.*, 2011b). En los últimos 20 años se han descubierto más especies de este género (Jiang y Xu 1996; Jiang *et al.*, 2006) y la utilidad de los metabolitos secundarios producidos por estos microorganismos ha trascendido en diversas líneas de investigación con fines biomédicos: Verma *et al.* (2013) publicaron por primera vez un protocolo (de un paso) para la síntesis de nanotriángulos de oro utilizando el extracto de una especie de *Saccharomonospora* endófito de las raíces de un árbol. Estas nanopartículas poseen propiedades ópticas únicas explotables en áreas de estudio de biosensores y diagnósticos biomédicos. Asimismo, se han descubierto propiedades anticáncer de los metabolitos de algunas especies de este género (Maloney *et al.*, 2009). Es reconocido el potencial de aplicación de las propiedades de los metabolitos secundarios producidos por especies del género *Saccharomonospora*. La cepa de *Saccharomonospora* marina obligada identificada en este trabajo podría poseer un potencial bioactivo muy prometedor que no ha sido evaluado, ya que es el primer registro de una cepa marina obligada de este género aislada de sedimentos marinos de México.

Con estos resultados y la información actual acerca de los seis géneros raros, es muy posible que las cepas marinas obligadas identificadas en este trabajo posean el potencial biotecnológico y biomédico característico de cada uno de los géneros investigados alrededor del mundo. Gracias a esto y a los esfuerzos que se inviertan en los próximos años, nuestro país podría establecer un futuro prometedor en el descubrimiento de nuevos agentes bioactivos de actinobacterias raras para combatir enfermedades de difícil tratamiento y patógenos humanos resistentes a antibióticos.

4.4. Efecto anticancerígeno y antibacteriano

Se evaluó el potencial bioactivo de 32 extractos crudos (16 de AcOEt y 16 de MeOH) obtenidos del cultivo de cepas marinas obligadas relacionadas con los géneros *Salinispora*, *Actinoalloteichus*, *Nocardiopsis*, *Micromonospora*, *Streptomyces* y *Saccharomonospora*.

En la evaluación de la actividad anticancerígena, un total de 11 extractos crudos presentaron un efecto anticancerígeno contra las células de cáncer colorectal HCT-116, cuatro de ellos extraídos con AcOEt y el resto con MeOH (Figura 4.2).

Como se observa en la figura 4.2a y b, tres extractos de AcOEt (PV-3b, PV-12n, y V-1b) presentaron bioactividades altas con valores de $CI_{50} < 0.076 \mu\text{g/mL}$. Solo un extracto de MeOH (PV-12n) presentó bioactividad alta, con un $CI_{50} < 0.076 \mu\text{g/mL}$, mientras que el resto de los extractos evaluados presentó valores de CI_{50} entre 0.249 y 11.33 $\mu\text{g/mL}$.

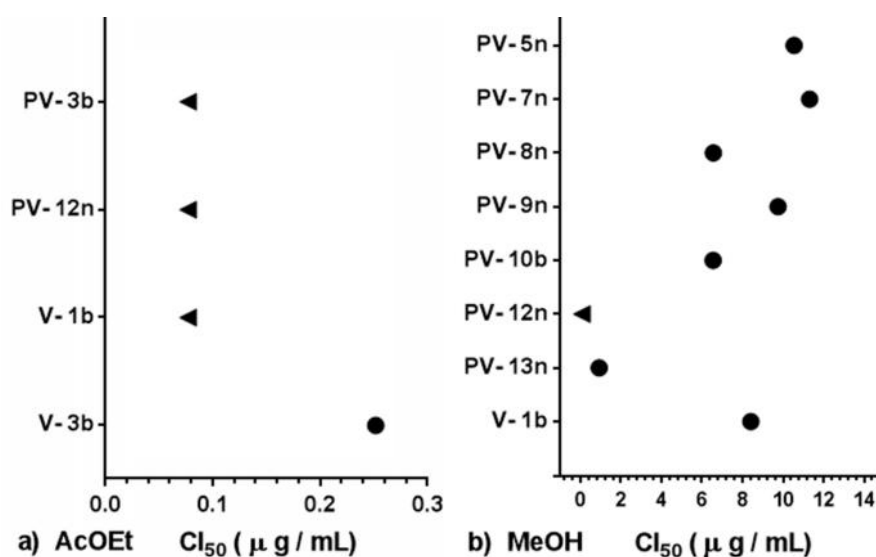


Figura 4.2. Concentraciones inhibitorias máximas medias (CI_{50}) de los extractos bioactivos de (a) AcOEt y (b) MeOH contra carcinoma colorectal HCT-116, obtenidos de actinobacterias marinas obligadas aisladas de sedimentos de Puerto Vallarta y Veracruz. El símbolo “ ◀ ” representa una concentración menor a la señalada, y el círculo “ ● ” una concentración puntual.

Los cuatro extractos más bioactivos contra células de cáncer se obtuvieron de las cepas marinas obligadas *Salinispora* y *Actinoalloteichus*. El potencial bioactivo de las especies del género *Salinispora* ha sido demostrado en diversas investigaciones internacionales (Maldonado *et al.*, 2005, Buchanan *et al.*, 2005 Jensen *et al.*, 2007, Fenical *et al.*, 2009) en las que se ha registrado alta actividad contra la línea celular HCT-116 de extractos y compuestos puros (e.g., $CI_{50} <$

Actinobacterias raras: evaluación del potencial anticancerígeno y antibacteriano de metabolitos secundarios

0.002 y 0.011 $\mu\text{g}/\text{mL}$) obtenidos de especies del género aisladas de sedimentos marinos. En México, también hay evidencia de bioactividad anticancerígena de extractos obtenidos de especies del género *Salinispora* (Becerril-Espinosa *et al.*, 2012, Torres-Beltrán *et al.*, 2012); sin embargo, no había sido antes reportada una bioactividad tan alta. Por otro lado, el potencial bioactivo de especies del género *Actinoalloteichus* ha sido reportado por Boudjelal *et al.* (2011a) y Vinothkumar y Parameswaran (2013), mientras que en México no hay actualmente registro de la bioactividad de los metabolitos secundarios producidos por algún integrante del género. Con base en esto, en este estudio se evalúa por primera vez el potencial bioactivo de dos cepas marinas obligadas del género *Actinoalloteichus*. Ambos extractos bioactivos correspondientes a las cepas *Actinoalloteichus* PV-3b y V-1b, registraron $\text{CI}_{50} < 0.076 \mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 4.2a), evidenciando el potencial biotecnológico y biomédico de los compuestos que los constituyen.

En la evaluación de la actividad antimicrobiana, un total de 20 extractos crudos presentaron efectos contra la bacteria patógena SARM, nueve de ellos obtenidos con AcOEt y el resto con MeOH (Figura 4.3 a y b).

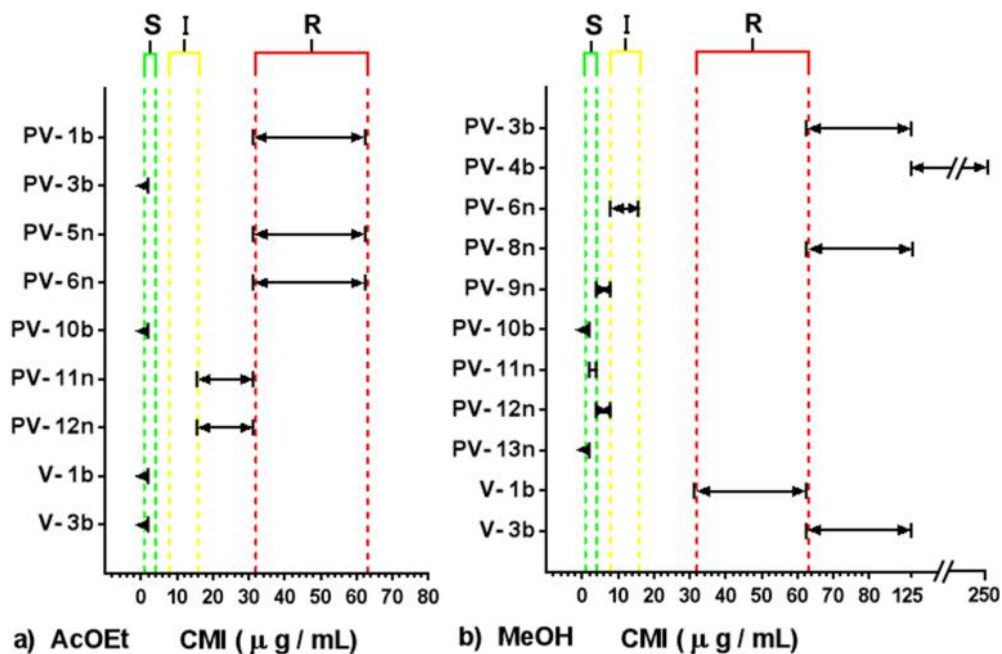


Figura 4.3. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los extractos crudos bioactivos de (a) AcOEt y (b) MeOH contra SARM, obtenidos de actinobacterias marinas obligadas aisladas de sedimentos de Puerto Vallarta y Veracruz. El símbolo " " representa una CMI menor a la señalada, las flechas " " un rango de CMI. Rangos del Nivel de efectividad: en verde Susceptible (S), en amarillo Intermedio (I) y en rojo Resistente (R).

Se calcularon y obtuvieron CMI's dentro de los tres rangos del nivel de efectividad descritos por Aucoin (2000). La CMI más baja fue de 1.953 y la máxima de 125-250 µg/mL. De los 20 extractos bioactivos contra SARM, siete fueron los que presentaron las bioactividades más altas (cuatro de AcOEt y tres de MeOH), cayendo en el nivel *S* con CMI de 0.195 a 3.906 µg/mL. Estos extractos fueron obtenidos de cepas de *Salinispora* (PV-13n), *Actinoalloteichus* (PV-3b y V-1b), *Nocardiopsis* (PV-10b, V-3b) y *Micromonospora* (PV-11n). Los extractos que registraron la CMI más similar al control positivo, el estándar antibiótico Vancomicina (CMI 2 µg/mL) empleado en el bioensayo *in vitro*, fueron de cepas de *Salinispora*, *Actinoalloteichus* y *Nocardiopsis*.

De los 13 extractos restantes, dos extractos (MeOH) de cepas de *Salinispora* presentaron bioactividades con CMI entre el nivel *S* y el nivel *I* (3.906 a 7.813 µg/mL), un extracto (MeOH) de *Salinispora* registró una bioactividad dentro del nivel *I* con una CMI de 7.813 a 15.625 µg/mL, dos extractos (AcOEt) de *Salinispora* y *Micromonospora* registraron bioactividades entre el nivel *I* y el nivel *R* con CMI's de 15.625 a 31.25 µg/mL, y los ocho extractos restantes (AcOEt y MeOH) de cepas de *Salinispora*, *Actinoalloteichus* y *Nocardiopsis*, registraron CMI's de 31.25 a 250 µg/mL, cayendo dentro del nivel *R*.

Con estos resultados, se realiza el primer registro del potencial antibacteriano de los metabolitos secundarios producidos por cepas marinas obligadas de los géneros *Salinispora*, *Actinoalloteichus*, *Nocardiopsis* y *Micromonospora* de costas de Puerto Vallarta y Veracruz. Del género *Salinispora* ya se ha reportado alta bioactividad de extractos crudos contra SARM de cepas aisladas de sedimentos marinos del Golfo de California (Becerril-Espinosa *et al.*, 2012) de las Bahamas y el Mar Rojo, entre otros (Kim *et al.*, 2006; Udworthy *et al.*, 2007). También se registran por primera vez altas bioactividades contra SARM (similares a la del antibiótico Vancomicina) de extractos obtenidos de cepas marinas obligadas de *Actinoalloteichus* y *Nocardiopsis*.

Los géneros *Actinoalloteichus* y *Nocardiopsis* poseen especies productoras de diversos compuestos con potencial antibiótico y anticancerígeno. En el género

Actinoalloteichus se han identificado especies que producen diversos compuestos activos, como péptidos citotóxicos (Cho, *et al.*, 2007), biperidinas y caerulomicinas con efecto anticáncer, antibacteriano, entre muchos otros (Fu *et al.*, 2011). En el género *Nocardiopsis* se han identificado especies con potenciales anticancerígenos y antimicrobianos contra otras bacterias patógenas como *Pseudomona vulgaris* y *Pseudomona aeruginosa* (Becerril-Espinosa *et al.*, 2012), así como, especies productoras de péptidos inhibidores de la síntesis de proteínas (Engelhardt *et al.*, 2010), entre otras.

Los resultados aquí expuestos acerca del potencial anticancerígeno y antimicrobiano de los extractos de cepas marinas obligadas de géneros *Actinoalloteichus*, *Nocardiopsis*, *Salinispora* y *Micromonospora*, confirman que los sedimentos de ambientes marinos de nuestro país, como las costas de Jalisco y Veracruz, son fuente potencial de microorganismos con potencial antibiótico y potencial anticancerígeno. Derivado de lo anterior, se cumple uno de los objetivos secundarios planteados en este estudio y, en consecuencia, se comprueban dos de las hipótesis postuladas en este estudio (Capítulo 2, hipótesis b y c).

Alrededor del mundo, especies de los géneros aquí evaluados son objeto de estudio en diversas líneas de investigación, la explotación y/o aplicación de los metabolitos secundarios que producen ejercen un impacto muy valioso en la salud, nutrición, y economía de la sociedad. En México, la aplicación biotecnológica y biomédica de estas sustancias químicas aún se encuentra en desarrollo. No obstante, los resultados de este estudio evidencian que los ecosistemas marinos de nuestro país guardan un recurso biotecnológico al alcance de nuestra mano, el cual requiere de más recursos y esfuerzos destinados a su investigación.

4.5. Compuestos bioactivos

En base a los resultados del potencial bioactivo de las cepas bajo estudio, los extractos crudos más bioactivos que pertenecen a los dos géneros marinos obligados que no han sido reportados hasta la fecha en otros estudios realizados en México, fueron seleccionados para su análisis en CL-EM: *Actinoalloteichus* PV-3b (AcOEt), V-1b (AcOEt), y *Nocardioopsis* V-3b (AcOEt) y PV-10b (AcOEt, MeOH). Asimismo, se obtuvieron los cromatogramas de los blancos del medio de cultivo A1-75% (AcOEt y MeOH), los cuales fueron comparados con los de los extractos analizados para diferenciar aquellos picos relacionados con la matriz del medio de cultivo (Figura 4.4).

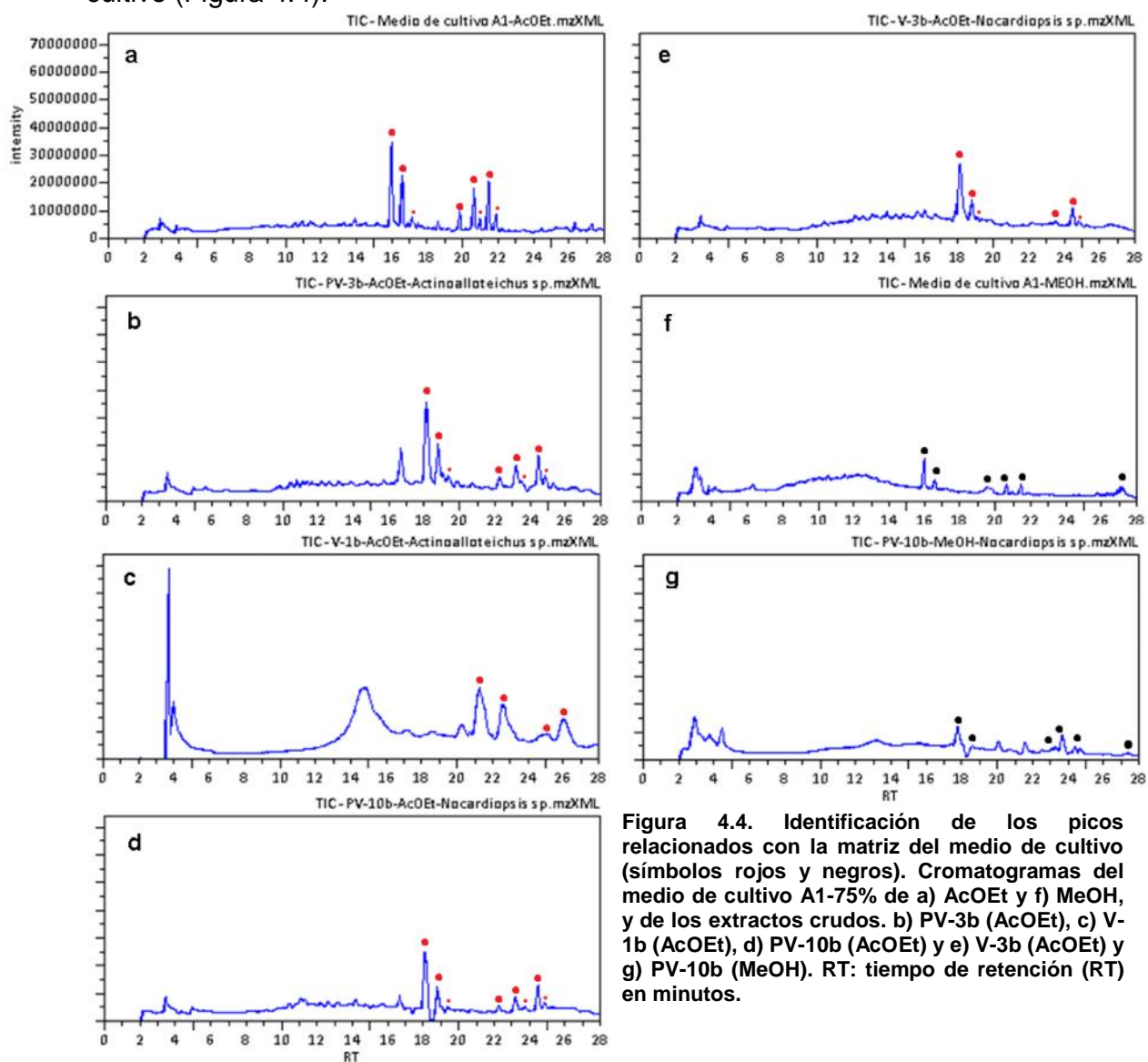


Figura 4.4. Identificación de los picos relacionados con la matriz del medio de cultivo (símbolos rojos y negros). Cromatogramas del medio de cultivo A1-75% de a) AcOEt y f) MeOH, y de los extractos crudos. b) PV-3b (AcOEt), c) V-1b (AcOEt), d) PV-10b (AcOEt) y e) V-3b (AcOEt) y g) PV-10b (MeOH). RT: tiempo de retención (RT) en minutos.

En la literatura internacional se han reportado diversos compuestos con propiedades bioactivas antimicrobianas, anticancerígenas, antifúngicas y antitumorales, entre otros, producidos por algunos integrantes de los géneros raros *Actinoalloteichus* y *Nocardiopsis*. En la tabla 4.3 se enlistan 26 compuestos con sus propiedades bioactivas, los fragmentos de masas característicos en sus espectros de masa (EM) y la especie actinobacteriana que los produce. Los resultados de la búsqueda en los EM evaluados refleja la posible presencia de al menos siete compuestos bioactivos en la matriz de metabolitos secundarios producidos por las cepas de *Actinoalloteichus* y *Nocardiopsis*.

EM de extractos bioactivos de *Actinoalloteichus* (AcOEt): en los EM de los extractos bioactivos de *Actinoalloteichus*, PV-3b y V-1b (AcOEt), se identificaron los fragmentos de masas característicos de cuatro compuestos biológicamente activos pertenecientes a las biperidinas. En la figura 4.5 se pueden observar los fragmentos de masas 403 y 404 m/z que podrían corresponder al compuesto cyanogriside A y su isómero cyanogriside D (Tabla 4.3) en el extracto PV-3b (AcOEt). Cyanogriside A-D es un derivado de las biperidinas, aislado por primera vez del extracto crudo de AcOEt obtenido del cultivo del actinomiceto marino *Actinoalloteichus cyanogriseu*, actinobacteria aislada de sedimentos marinos de la costa de Weihai, China (Fu *et al.*, 2011a). Fu *et al.* (2011b) reportan que el extracto crudo de esta especie mostró una citotoxicidad significativa contra células de leucemia mieloide crónica K562 y que el compuesto puro (cyanogriside A) mostró efecto nocivo moderado contra las líneas celulares MCF-7 (cáncer de mama) y KB (cáncer de pulmón), así como K562. El extracto crudo PV-3b también se obtuvo con AcOEt, lo que sumado a la presencia de los fragmentos de masa identificados y al potencial biosintético reconocido en especies del género, es posible que este compuesto se encuentre en la matriz de metabolitos secundarios producidos por la cepa PV-3b *Actinoalloteichus sp* e intervenga en el efecto citotóxico sobre las células de cáncer de colon HCT-116 empleadas en este estudio.

Actinobacterias raras: evaluación del potencial anticancerígeno y antibacteriano de metabolitos secundarios

Tabla 4.3 Compuestos bioactivos producidos por algunas especies de los géneros raros *Actinoalloteichus* y *Nocardiopsis*. Efecto que poseen los compuestos, CT: citotóxico, AB: antibacteriano, AF: antifúngico, AP: antiprotozoario y n/d: no determinado. Técnica espectroscópica empleada (HR: High resolution, ESI: Electrospray ionization, MS: mass spectrography) y fragmentos de masas característicos en unidades de masa/carga (m/z)

Compuesto	Efecto	Técnica empleada y fragmentos de masa	Actinobacteria	Referencia
Cyanogriside A	CT	HR-ESI-MS 404.1464 m/z [M+H] ⁺	<i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i>	Fu <i>et al.</i> , 2011a
Cyanogriside B	n/d	HR-ESI-MS 413.1319 m/z [M+Na] ⁺	<i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i>	Fu <i>et al.</i> , 2011a
Cyanogriside C	n/d	HR-ESI-MS 412.1129 m/z [M+Na] ⁺	<i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i>	Fu <i>et al.</i> , 2011a
Cyanogriside D	n/d	HR-ESI-MS 404.1464 m/z [M+H] ⁺	<i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i>	Fu <i>et al.</i> , 2011a
Caerulomicina A	CT, AB	ESI-MS 230 m/z [M+H] ⁺	<i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i>	Fu <i>et al.</i> , 2011b
Caerulomicina F	CT	HR-ESI-MS 217.0976 m/z [M+H] ⁺	<i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i>	Fu <i>et al.</i> , 2011b
Caerulomicina G	CT	HR-ESI-MS 247.1079 m/z [M+H] ⁺	<i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i>	Fu <i>et al.</i> , 2011b
Caerulomicina H	CT	HR-ESI-MS 216.0781 m/z [M+H] ⁺	<i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i>	Fu <i>et al.</i> , 2011b
Caerulomicina I	CT	HR-ESI-MS 282.0855 m/z [M+Na] ⁺	<i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i>	Fu <i>et al.</i> , 2011b
Caerulomicina J	CT	HR-ESI-MS 266.0905 m/z [M+Na] ⁺	<i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i>	Fu <i>et al.</i> , 2011b
Caerulomicina K	CT	HR-ESI-MS 229.0968 m/z [M+H] ⁺	<i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i>	Fu <i>et al.</i> , 2011b
Lucentamicina A	CT, AB	HR-ESI-TOF 543.3298 m/z [M+H] ⁺ , 565.3109 [M+Na] ⁺	<i>Nocardiopsis lucentensis</i>	Cho <i>et al.</i> , 2007
Lucentamicina B	CT, AB	HR-ESI-TOF 596.3532 m/z [M+H] ⁺ , 618.3343 [M+Na] ⁺	<i>Nocardiopsis lucentensis</i>	Cho <i>et al.</i> , 2007
Kalafungin	AB, AF, AP	318.0760 m/z	<i>Nocardiopsis dassononvillei</i>	Tsujibo <i>et al.</i> , 1990
3-Trehalosamina	AB	505 m/z, 204, 227, 392, 505 m/z	<i>Nocardiopsis trehalosei sp. nov.</i>	Dolak <i>et al.</i> , 1980
Metoxineihumicina	CT	ESI-MS 357.0 m/z [M+Na] ⁺ , 333.1 [M+H] ⁺	<i>Nocardiopsis alba</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2013
3-Benzilpiperazina-6-(4-metoxybenzylideno)-2,5-diona	CT	ESI-MS 345.1 m/z [M+Na] ⁺ , 321.3 [M+H] ⁺	<i>Nocardiopsis alba</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2013
(S, Z)-3-Benzilideno-6-metilpiperazina-2,5-diona	CT	ESI-MS 217.4 m/z [M+H] ⁺	<i>Nocardiopsis alba</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2013
(S, Z)-3-Benzilideno-6-isopropilpiperazina-2,5-diona	CT	ESI-MS 267.3 m/z [M+Na] ⁺ , 245.2 [M+H] ⁺	<i>Nocardiopsis alba</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2013
(3Z, 6Z)-3-(4-Metoxibencilideno)-6-(2-metilpropilideno)piperazina-2,5-diona	CT	ESI-MS 309.2 m/z [M+Na] ⁺	<i>Nocardiopsis alba</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2013
XR334	CT	ESI-MS 221.1 m/z [M+H] ⁺ , 343.1 m/z [M+Na] ⁺	<i>Nocardiopsis alba</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2013
2-Metoxinaftaleno-1,4-diona	CT	ESI-MS 211.2 m/z [M+H] ⁺ , 243.2 m/z [M+Na] ⁺	<i>Nocardiopsis alba</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2013
Ácido 1-Hidroxi-4-metoxi-2-naftoico	CT	ESI-MS 241.0 m/z [M+Na] ⁺	<i>Nocardiopsis alba</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2013
6-Hidroxi-4,2,3,4-tetrametoxi-p-terfenil	CT, AB, AF	HR-ESI-MS 366.1474 m/z	<i>Nocardiopsis gilva</i>	Tian <i>et al.</i> , 2013
4,7-Bis(4-metoxifenil)-6-hidroxi-5-metoxibenzo[d]tiazol	CT, AB, AF	HR-ESI-MS pico base 394.1113 m/z	<i>Nocardiopsis gilva</i>	Tian <i>et al.</i> , 2013
TP-1161	AB	HR-MS 592.63009 m/z [M+H+Na] ²⁺	<i>Nocardiopsis sp</i>	Engelhardt <i>et al.</i> , 2010

Continuando con la búsqueda de otros fragmentos de masas en el mismo extracto (PV-3b, AcOEt), se localizaron los fragmentos 215 y 216 m/z (Figura 4.6) que podrían corresponder al compuesto caerulomicina H (Tabla 4.3). Las caerulomicinas son alcaloides biperidinas que poseen actividad antibiótica, fitotóxica e inmunosupresora (Singla *et al.*, 2007). Las caerulomicinas (Tabla 4.3) también fueron aisladas por primera vez de extractos de AcOEt del actinomiceto marino *Actinoalloteichus cyanogriseu* (Fu *et al.*, 2011a). Sobre la caerulomicina H, Fu *et al.* (2011b) reportan actividades potentes contra líneas celulares de cáncer de leucemia humana (K562, HL-60) y cáncer de pulmón humano (A549 y KB), evidenciando el potencial biotecnológico de especies de *Actinoalloteichus*. Este tipo de compuestos podría justificar en el extracto PV-3b (AcOEt) la presencia de actividad antibacteriana contra SARM y citotóxica sobre células HCT-116.

Asímismo, en la figura 4.7 y 4.8 (extracto V-1b, AcOEt de *Actinoalloteichus sp.*) se pueden observar los fragmentos de masas 229 m/z, 230 m/z, y 339 m/z, 330 m/z que podrían corresponder a la caerulomicina A y K, respectivamente. Estos dos compuestos también fueron aislados de *A. cyanogriseu* por Fu *et al.* (2011b) quienes reportaron efecto citotóxico sobre células de cáncer de pulmón (A549) y de leucemia humana (HL-60). Estos compuestos podrían estar reflejando el efecto anticancerígeno que posee este extracto sobre las células de cáncer de colon (HCT-116) y el efecto antibacteriano contra SARM.

EM de extractos bioactivos de *Nocardiosis* (AcOEt): la búsqueda e identificación preliminar de compuestos bioactivos producidos por integrantes del género marino obligado *Nocardiosis* también arrojó resultados relevantes.

Es reconocido que cepas del género *Nocardiosis* producen una amplia gama de metabolitos secundarios (Raju *et al.*, 2010). Investigaciones internacionales han conducido al aislamiento de muchos tipos de metabolitos secundarios, tales como macrólidos policéptidos, macrolactonas, -pironas, alcaloides, péptidos, compuestos cloroaromáticos, etc. (Wender y Longcore, 2009). Se ha reportado que muchos de ellos poseen bioactividades asociadas a apoptosis, citotoxicidad, propiedades de activación de macrófagos, etc. (Kim *et al.*, 1997).

Actinobacterias raras: evaluación del potencial anticancerígeno y antibacteriano de metabolitos secundarios

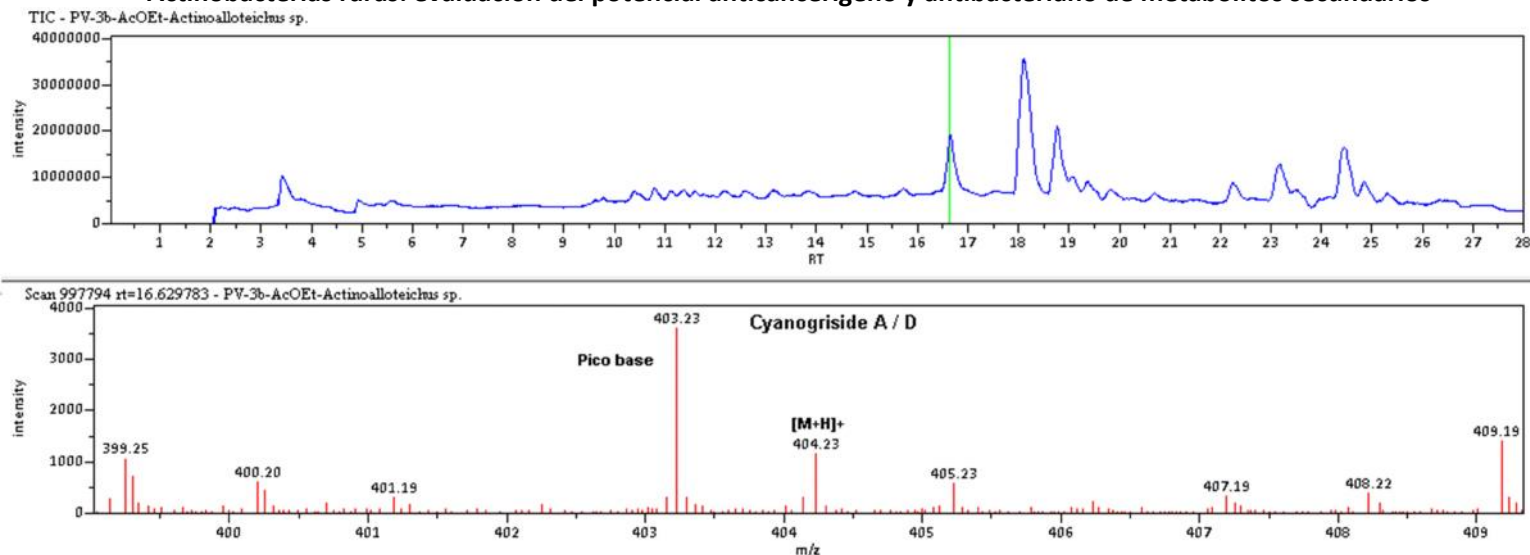


Figura 4.5 Cromatograma y espectro de masas del extracto PV-3b (AcOEt) *Actinoalloteichus sp.* Fragmentos de masas correspondientes a los compuestos citotóxicos cyanogriside A y D (Fu *et al.*, 2011). La línea verde indica el punto de origen del EM en el cromatograma de la muestra. El pico base podría ser el fragmento de masa con la mayor intensidad o abundancia del compuesto.

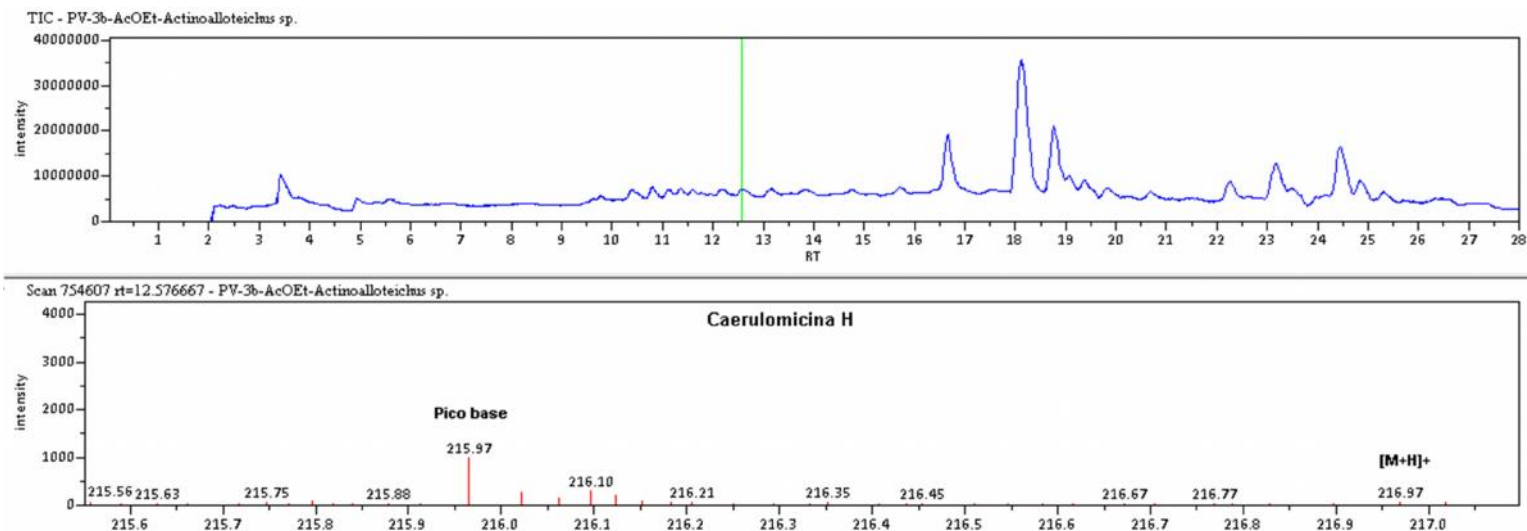


Figura 4.6 Cromatograma y espectro de masa del extracto PV-3b (AcOEt) *Actinoalloteichus sp.* Fragmentos de masas correspondientes al compuesto citotóxico caerulomicina H (Fu *et al.*, 2011b).

Actinobacterias raras: evaluación del potencial anticancerígeno y antibacteriano de metabolitos secundarios

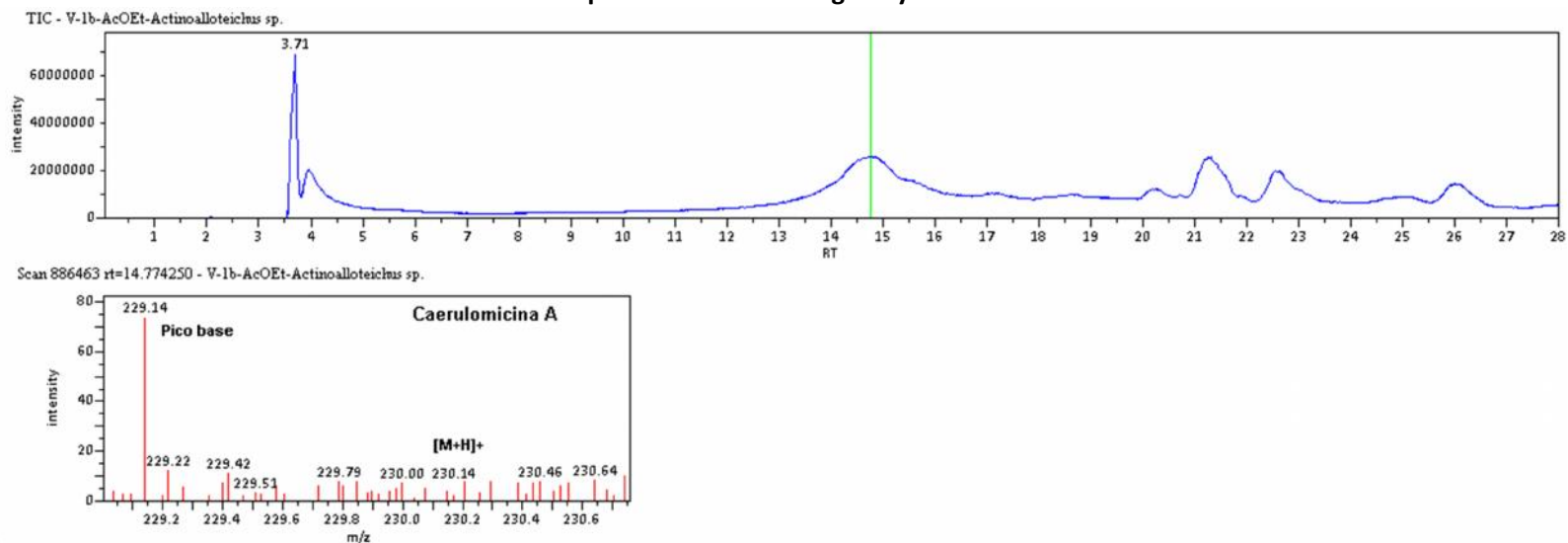


Figura 4.7 Cromatograma y espectro de masa del extracto V-1b (AcOEt) *Actinoalloteichus sp.* Fragmentos de masas correspondientes al compuesto citotóxico caerulomicina A (Fu *et al.*, 2011b).

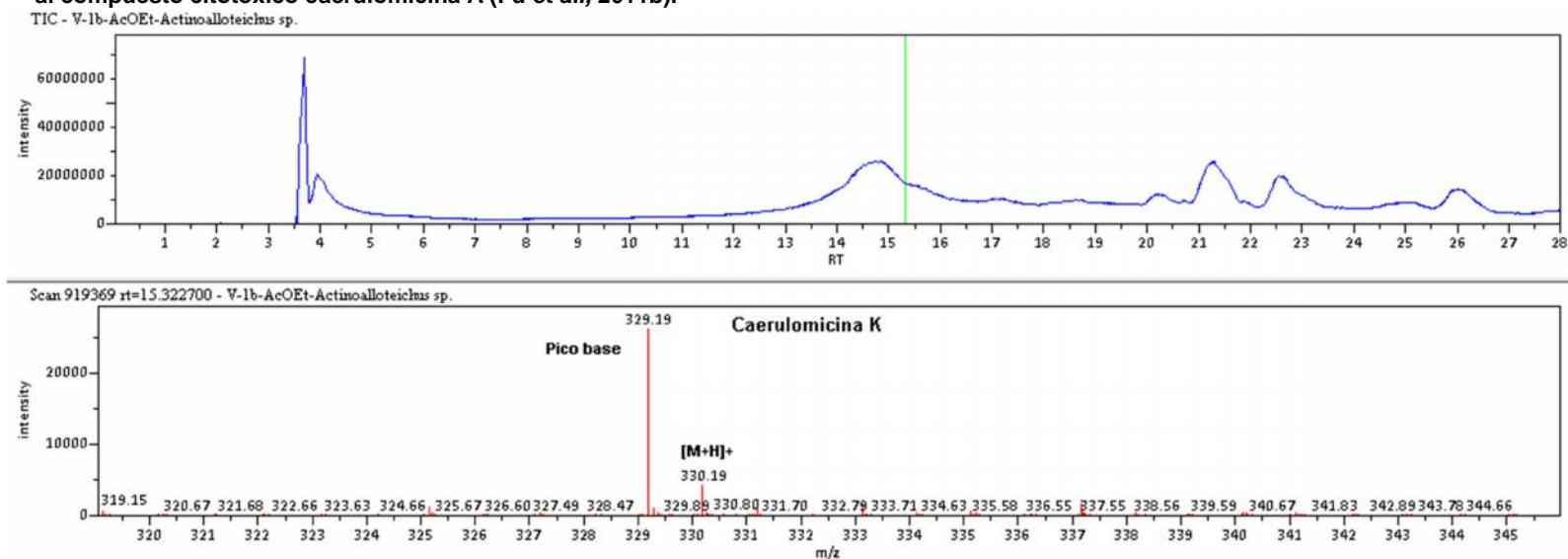


Figura 4.8 Cromatograma y espectro de masa de extracto V-1b (AcOEt) *Actinoalloteichus sp.* Fragmentos correspondientes al compuesto citotóxico caerulomicina K (Fu *et al.*, 2011b).

Sin embargo, poco se sabe acerca de los metabolitos secundarios de actinomicetos marinos obligados o halófilos.

En relación a los extractos V-3b y PV-10b (AcOEt) de las cepas marinas obligadas de *Nocardiopsis*, se pueden observar en las figuras 4.9 y 4.10 los fragmentos de masa 393 y 394 m/z, que podrían corresponder al compuesto 4,7-bis(4-metoxifenil)-6-hidroxi-5-metoxibenzo[d]tiazol (Tabla 4.3), que corresponde a un hidrocarburo aromático bioactivo (Tian *et al.*, 2013). Este compuesto fue aislado por primera vez del actinomiceto halófilo *Nocardiopsis gilva* (YIM 90087), microorganismo aislado de suelos hipersalinos de la provincia Xinjiang en China (Li *et al.*, 2006). Se ha reportado que este tipo de compuestos poseen propiedades antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes (Tian *et al.*, 2013), sin embargo, no hay mayor información acerca del alcance de su potencial bioactivo. La posible presencia de este hidrocarburo aromático en los dos extractos (V-3b y PV-10b) podría explicar el efecto antibacteriano que poseen contra SARM.

Extendiendo la búsqueda de otros compuestos bioactivos que justificaran el potencial citotóxico del extracto V-3b (AcOEt), como se observa en la figura 4.11, se encontraron los fragmentos de masa 595, 596 y 618 m/z, que podrían corresponder al compuesto lucentamicina B (Tabla 4.3). Estos compuestos son péptidos que fueron aislados por primera vez del extracto crudo de AcOEt (empleando resina Amberlita XAD-7) del cultivo de la actinobacteria *Nocardiopsis lucentensis* (CNR-712), microorganismo aislado de sedimentos marinos recolectados de un estanque salino superficial de la isla Pequeño San Salvador, en las Bahamas (Cho *et al.*, 2007). El extracto crudo del cultivo de esta especie demostró un efecto citotóxico sobre la línea celular de cáncer de colon (HCT-116) (Cho *et al.*, 2007), al igual que en nuestro estudio.

En base a estos resultados, el efecto antibacteriano y citotóxico que desplegaron los extractos V-3b y PV-10b (AcOEt) podría estar reflejando la presencia de hidrocarburos aromáticos y péptidos, que constituyen parte de los productos del metabolismo secundario de las cepas del género *Nocardiopsis* bajo estudio.

Actinobacterias raras: evaluación del potencial anticancerígeno v antibacteriano de metabolitos secundarios

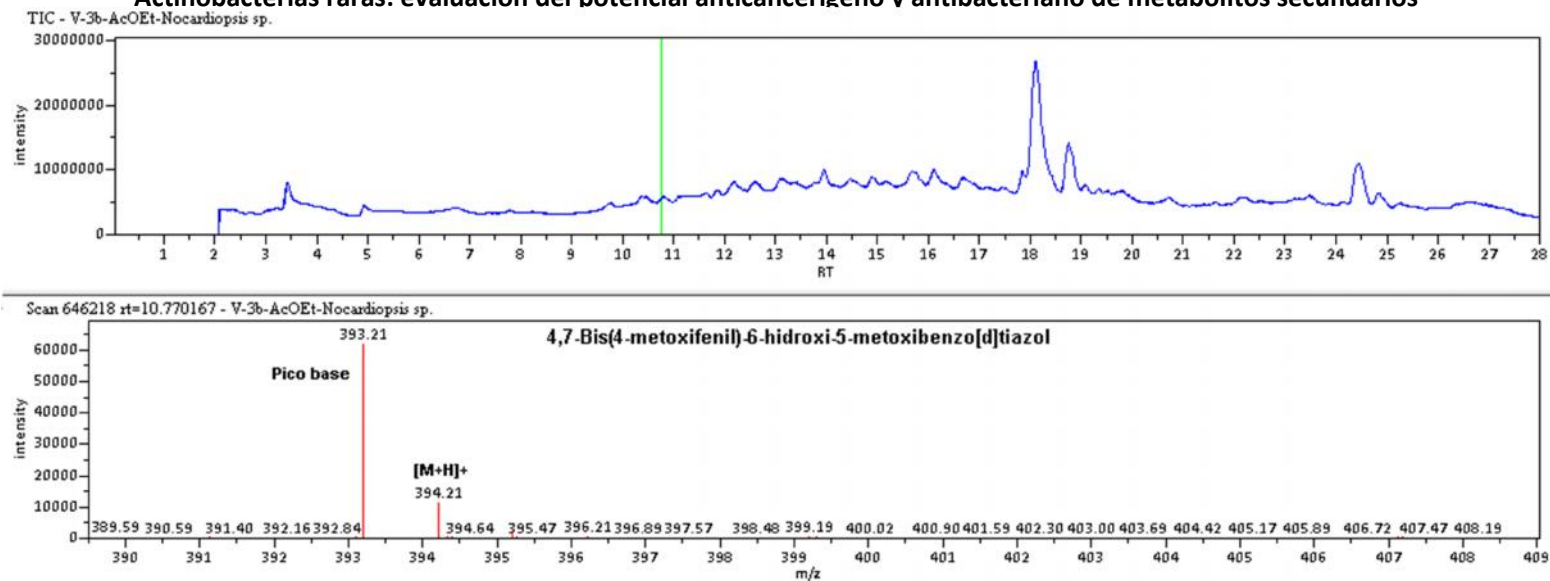


Figura 4.9 Cromatograma y espectro de masa del extracto V-3b (AcOEt) *Nocardopsis sp.* Fragmentos de masas correspondientes al compuesto citotóxico, antibacteriano, antifúngico 4,7-Bis (4-metoxifenil)-6-hidroxi-5-metoxibenzo[d]tiazol (Tian *et al.*, 2013).

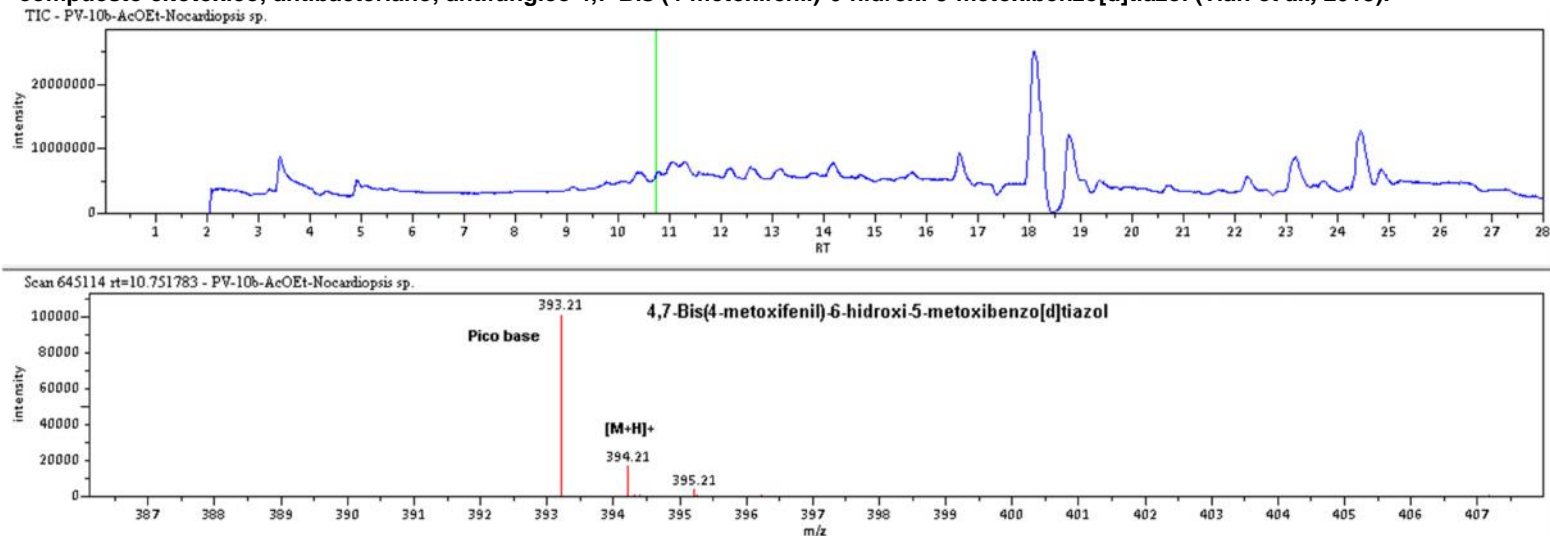


Figura 4.10 Cromatograma y espectro de masa del extracto PV-10b (AcOEt) *Nocardopsis sp.* Fragmentos de masas correspondientes al compuesto citotóxico, antibacteriano, antifúngico 4,7-Bis(4-metoxifenil)-6-hidroxi-5-metoxibenzo[d]tiazol (Tian *et al.*, 2013).

Actinobacterias raras: evaluación del potencial anticancerígeno y antibacteriano de metabolitos secundarios

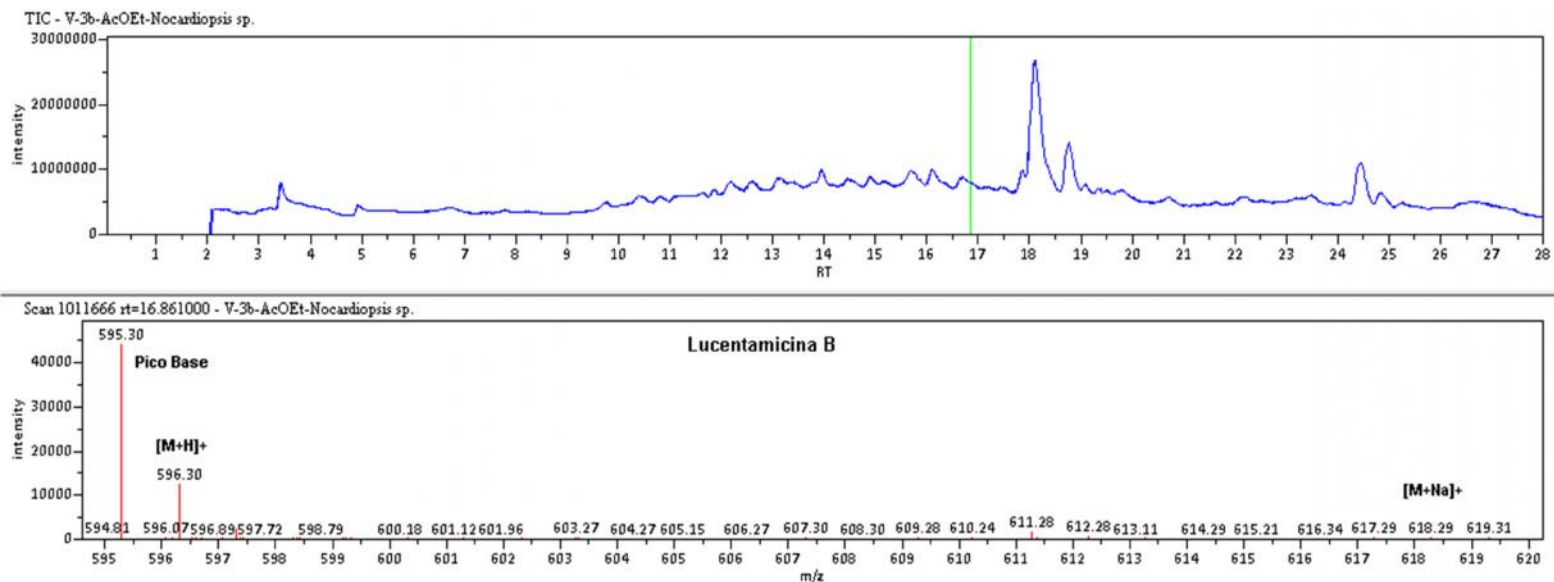


Figura 4.11 Cromatograma y espectro de masa del extracto V-3b (AcOEt) *Nocardiopsis sp.* Fragmentos de masas correspondientes al compuesto citotóxico lucentamicina B (Cho *et al.*, 2007).

EM del extracto bioactivo de *Nocardiopsis* (MeOH): finalmente, la búsqueda de compuestos bioactivos en el extracto crudo PV-10b de MeOH también arrojó la posible presencia de dos compuesto bioactivos que podrían ayudar a explicar el efecto nocivo de este extracto. En La figura 4.12 y 4.13 se evidencia la presencia de los fragmentos de masas 595, 596, 618 m/z y 217, 241 m/z, relacionados posiblemente con los compuestos bioactivos del ácido 1-hidroxi-4-metoxi-2-naftoico y lucentamicina B, respectivamente (Tabla 4.3). Como ya hemos visto, el péptido lucentamicina B posee potencial antibacteriano y anticancerígeno, por lo que podría justificar el potencial bioactivo de este extracto.

Actinobacterias raras: evaluación del potencial anticancerígeno y antibacteriano de metabolitos secundarios

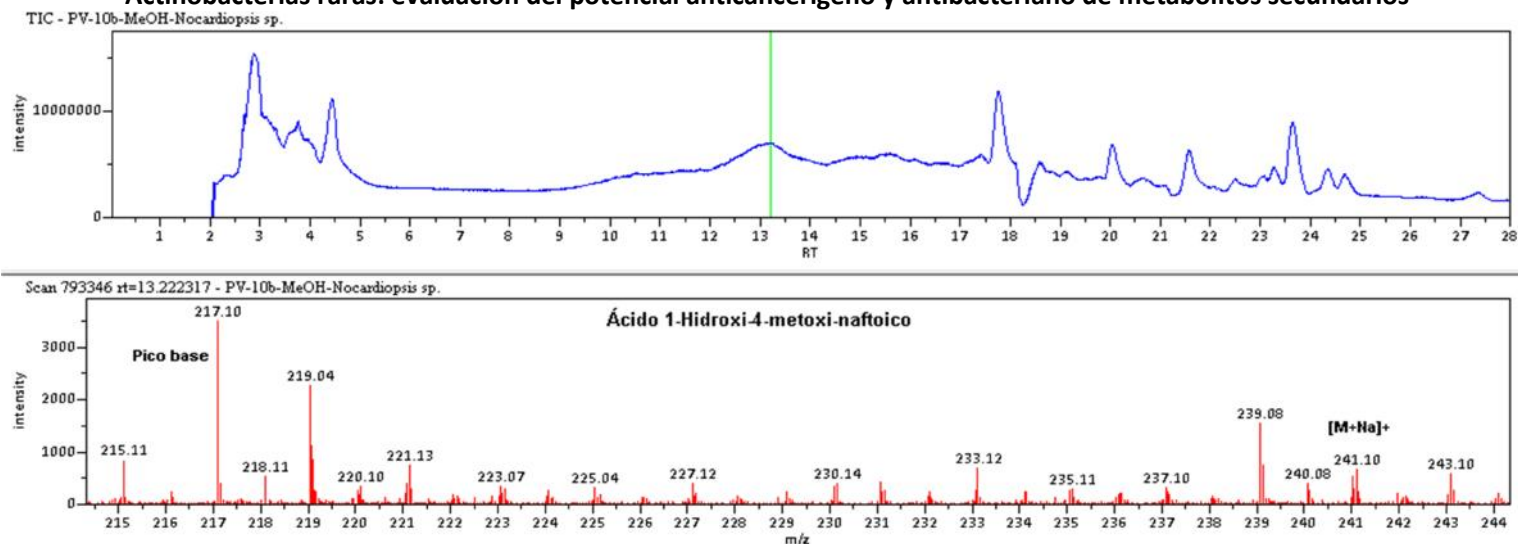


Figura 4.12 Cromatograma y espectro de masa del extracto PV-10b (MeOH) *Nocardopsis* sp. Fragmentos de masas correspondientes al compuesto citotóxico ácido 1-Hidroxi-4-metoxi-2-naftoico (Zhang *et al.*, 2013).

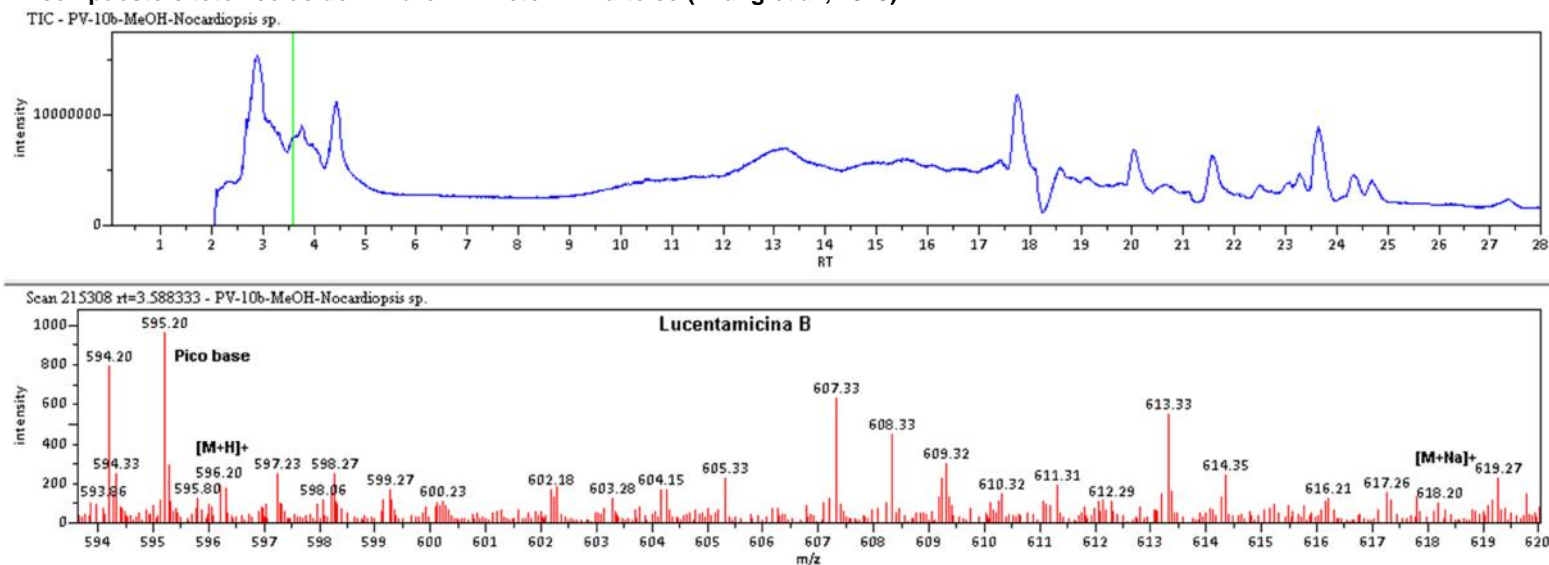


Figura 4.13 Cromatograma y espectro de masa del extracto PV-10b (MeOH) *Nocardopsis* sp. Fragmentos de masas correspondientes al compuesto citotóxico lucentamicina B (Cho *et al.*, 2007).

Sumado a esto, el ácido 1-hidroxi-4-metoxi-2-naftoico es un derivado peptídico bioactivo que fue aislado por primera vez de *Nocardiopsis alba* (SCSIO 03039), actinobacteria aislada de sedimentos profundos recolectados en el mar del Japón (Zhang *et al.*, 2013). Estos autores reportan la extracción de metabolitos secundarios con MeOH, cuya evaluación bioactiva del compuesto puro evidenció un efecto moderado sobre células de cáncer del sistema nervioso (SF-268), cáncer de mama (MCF-7) y cáncer de pulmón (NCI-H46). En base a estos resultados, es posible que la identificación preliminar de estos tipos de compuestos justifiquen el potencial antibacteriano y anticancerígeno que mostró el extracto PV-10b de MeOH contra SARM y sobre la células HCT-116, respectivamente.

En general, las evidencias colectadas a lo largo de este capítulo sobre la evaluación del potencial activo e identificación parcial de compuestos bioactivos, permiten respaldar el valor biotecnológico y biomédico que guardan las cepas marinas obligadas, ahora conocidas, procedentes de costas y mares de México. Sin duda alguna estos microorganismos poseen la capacidad de biosintetizar compuestos biológicamente activos, muchos de ellos aún desconocidos, por lo que se alienta a continuar con su investigación a fin de lograr día a día más avances en la producción del conocimiento científico y en el incremento de la investigación de los recursos microbiológicos de nuestros ecosistemas marinos, favoreciendo el desarrollo de la ciencia en México.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

Síntesis y apreciación de los resultados obtenidos.

Capítulo 5 Conclusiones

Los métodos y criterios empleados para el aislamiento e identificación de actinobacterias raras de sedimentos marinos del Golfo de California, Golfo de México y costas de Jalisco y Veracruz contribuyeron al alcance del objetivo general de este estudio. La identificación y selección de cepas poco estudiadas, con adaptaciones fisiológicas naturales, permiten reafirmar el potencial de los sedimentos marinos de Puerto Vallarta, Veracruz, Golfo de California y Golfo de México como fuente de especies de actinobacterias raras.

Se realizó el primer registro documentado de la presencia de cepas marinas obligadas del género *Actinoalloteichus*, *Nocardiopsis*, *Micromonospora*, *Streptomyces*, y *Saccharomonospora* en sedimentos marinos de México. Las cepas marinas obligadas de los géneros *Actinoalloteichus*, *Nocardiopsis*, *Salinispora*, *Streptomyces*, *Saccharomonospora*, y *Micromonospora*, biológicamente activas, que forman parte de la comunidad microbiológica de los sedimentos marinos de diversas regiones del litoral Mexicano, son un recurso nacional que podría considerarse prácticamente como ilimitado y en espera de ser explotado intensamente. Las cepas marinas obligadas de los géneros *Actinoalloteichus* y *Nocardiopsis* poseen la capacidad de producir diversos tipos de compuestos químicos bioactivos bajo las condiciones de cultivo y experimentación empleados en esta investigación.

Con la reconocida capacidad biosintética de estos géneros, evidenciada alrededor del mundo y en este estudio, se deja expuesto otro camino por el cual es posible continuar con la investigación de los metabolitos secundarios aquí evaluados. Haciendo uso de la elucidación analítica de los compuestos presentes en los extractos de cepas marinas obligadas poco estudiadas, sin duda alguna se

Actinobacterias raras: evaluación del potencial anticancerígeno y antibacteriano de metabolitos secundarios

puede contribuir al progreso en el descubrimiento de nuevos fármacos en nuestro país.

Los resultados obtenidos en este estudio resaltan la importancia del desarrollo de la investigación enfocada hacia el descubrimiento de nuevos agentes bioactivos aislados de actinobacterias raras y/o poco estudiadas en México. Más aún con la evidente demanda del cuidado de la salud humana, especialmente en lo relativo a la lucha contra enfermedades humanas de difícil tratamiento y/o al combate de patógenos humanos.

Con el fin de obtener más y mejores beneficios de la bio-riqueza de nuestros ecosistemas, es primordial continuar la exploración de la microbiología de los ambientes costeros y oceánicos de nuestro país.

5.1 Agradecimientos

Agradecimientos especiales al Dr. Alexei Licea Navarro y la M. en C. Irasema Oroz Parra del Laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas del CICESE, por el apoyo con los primeros bioensayos *in vitro* y por facilitar las muestras de sedimentos del Golfo de México.

Agradecimientos especiales al Dr. Paul Jensen y a la M. en C. Natalie Millán del CMBB del Scripps, San Diego, por toda la confianza y apoyo brindados, por facilitar el uso de sus instalaciones, tiempo y demás recursos científicos.

Agradecimientos especiales a mis compañeros Dulce, Liz, Honorio y Héctor por el apoyo brindado durante el trabajo en laboratorio.

Agradecimientos especiales a Aní y Julia por la realización de los ensayos *in vitro* en el CMBB del Scripps.

CAPÍTULO 6

CATÁLOGO FOTOGRAFICO-DESCRIPTIVO

Capítulo 6 Catálogo fotográfico-descriptivo

Actinoalloteichus

Código cepa:

V-1b (CNY484)

Sedimento:

Veracruz.

Coloración:

Blanco/beige

Esporas:

Blancas



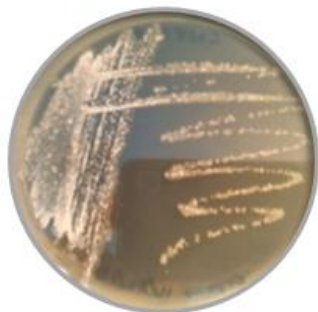
Medio de cultivo: A1-75%

Gram-positiva

Micelio sustrato: no se fragmenta, de mayor diámetro al micelio aéreo, muy enterrado.

Micelio aéreo: superficie lisa cuando no hay esporas. Las Hifas del micelio aéreo sostienen las esporas blancas.

Morfología colonial: irregular, ondulada, convexa, pequeña, lisa, brillante, no pigmentada, traslúcida.



Actinomadura

Código Cepa:

GM-14b

Sedimento:

Golfo de México

Coloración;

Beige/blanco

Esporas:

Blancas



Medio de cultivo: A1-75%

Gram-positiva

Micelio sustrato: no se fragmenta, de mayor diámetro al micelio aéreo, muy enterrado.

Micelio aéreo: superficie lisa, hifas irregularmente prominentes.

Morfología colonial: circular, redondeada, planoconvexa, moderada, lisa, opaca, no pigmentada, traslúcida



Actinophytocola

Código cepa:

GM-7b

Sedimento:

Golfo de México

Coloración:

Blanco

Esporas:

Blancas



Medio de cultivo: A1-75%

Gram-positiva

Micelio sustrato: se fragmenta, de menor diámetro al micelio aéreo.

Micelio aéreo: superficie rugosa, muy prominente.

Morfología colonial: irregular, ondulada, umbilicada, mediana, rugosa, tipo talco, no pigmentada, opaca.



Astrosporangium

Código Cepa:

GM-11r

Sedimentos:

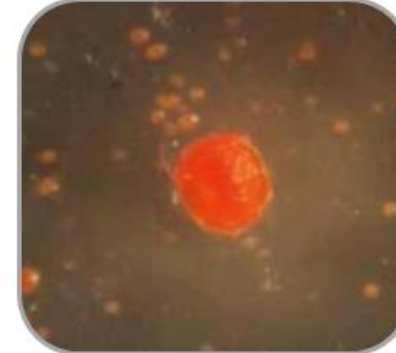
Golfo de México

Coloración:

Rojo/Naranja

Esporas:

No



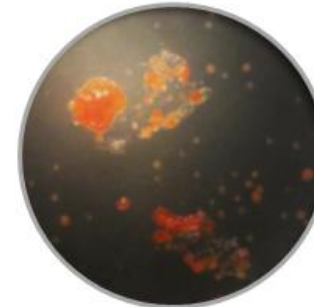
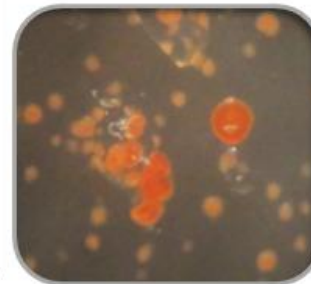
Medio de cultivo: A1-75%

Gram-positiva

Micelio sustrato: no se fragmenta, generalmente de igual diámetro al micelio aéreo, poco enterrado.

Micelio aéreo: superficie rugosa, prominente en colonias maduras, liso en jóvenes.

Morfología colonial: circular, ondulada, convexa, pequeña, rugosas, pigmentada, translúcida.



Micromonospora

Código cepa:

GM-3n

Sedimentos:

Golfo de México

Coloración:

Naranja

Esporas:

No

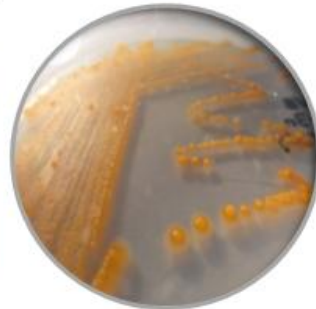
Medio de cultivo: A1-75%

Gram-positiva

Micelio sustrato: no se fragmenta, generalmente de mayor diámetro al micelio aéreo, muy enterrado.

Micelio aéreo: superficie lisa y rugosa, prominente.

Morfología colonial: irregular, ondulada, acuminada, mediana, lisa-rugosa, brillante, pigmentada, translúcida.



Nocardiosis

Código cepa:

V-3b

Sedimentos:

Veracruz

Coloración:

Beige/blanco

Esporas:

Blancas

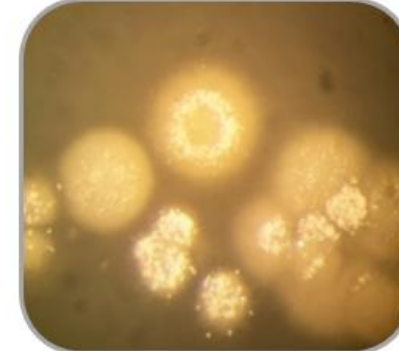
Medio de cultivo: A1-75%

Gram-positiva

Micelio sustrato: no se fragmenta, generalmente de mayor diámetro al micelio aéreo, muy enterrado.

Micelio aéreo: superficie lisa cuándo no hay esporas.

Morfología colonial: circular, redondeada, convexa, mediana, lisa, brillante, no pigmentada, translúcida.



Nonomuraea

Código cepa:

GM-18b

Sedimentos:

Golfo de México

Coloración:

Beige/blanco

Esporas:

Blancas



Medio de cultivo: A1-75%

Gram-positiva

Micelio sustrato: no se fragmenta, generalmente de mayor diámetro al micelio aéreo, muy enterrado.

Micelio aéreo: superficie lisa cuándo no hay esporas., poco prominente.

Morfología colonial: circular, ondulada, convexa, mediana, lisa, brillante, no pigmentada, translúcida.



Rhodococcus

Código cepa:

V-14r

Sedimentos:

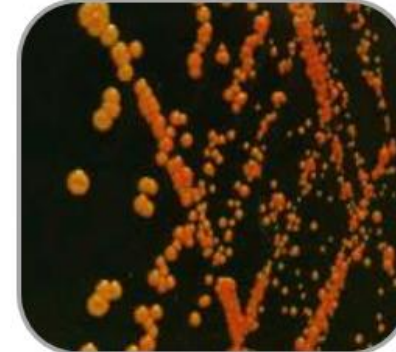
Veracruz

Coloración:

Rojo/naranja

Esporas:

No



Medio de cultivo: A1-75%

Gram-positiva

Micelio sustrato: no se fragmenta, de igual diámetro al micelio aéreo, poco enterrado.

Micelio aéreo: superficie lisa, poco prominente.

Morfología colonial: circular, redondeada, convexa, pequeña, lisa, brillante, pigmentada, opaca.



Streptomyces

Código cepa:

GC-1b

Sedimentos:

G. de California

Coloración:

Beige/Blanco

Esporas:

Blancas/gris/beige

Medio de cultivo: A1-75%

Gram-positiva

Micelio sustrato: no se fragmenta, generalmente de mayor diámetro al micelio aéreo.

Micelio aéreo: superficie lisa cuando no hay esporas, ligeramente prominente en colonias maduras.

Morfología colonial: irregular, ondulada, convexa/papilada/acuminada, mediana, lisa-rugosa, no pigmentada, traslúcida.



Salinispora

Código cepa:

PV-9n (CNY557)

Sedimentos:

Veracruz

Coloración:

Naranja

Esporas:

Negras

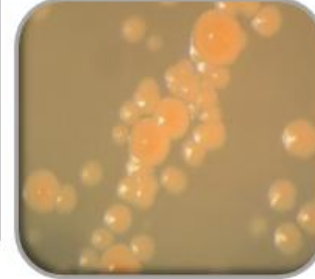
Medio de cultivo: A1-75%

Gram-positiva

Micelio sustrato: no se fragmenta, generalmente de igual diámetro al micelio aéreo, poco enterrado.

Micelio aéreo: superficie lisa cuando no hay esporas, rugosas con hifas filamentosas prominentes en colonias maduras.

Morfología colonial: circular, redondeada, convexa-acuminada, pequeña, lisa-rugosa, pigmentada, traslúcida.



Streptosporangium

Código cepa:

V-13r

Sedimentos:

Veracruz

Coloración:

Rojo

Esporas:

ND



Medio de cultivo: A1-75%

Gram-positiva

Micelio sustrato: no se fragmenta, generalmente de mayor diámetro al micelio aéreo.

Micelio aéreo: superficie rugosa, poco prominente.

Morfología colonial: circular, ondulada, convexa, pequeña, rugosas, pigmentada, opaca.

Verrucosispora

Código cepa:

V-12b (CNY881)

Sedimentos:

Veracruz

Coloración:

Naranja

Esporas:

Naranjas claras

Medio de cultivo: A1-75%

Gram-positiva

Micelio sustrato: se fragmenta, generalmente de menor diámetro al micelio aéreo, poco profundo.

Micelio aéreo: superficie lisa cuándo no hay esporas, prominente en colonias maduras.

Morfología colonial: irregular, ondulada, acuminada, mediana, lisa-rugosa, brillante, pigmentada, traslúcida.



Referencias

- Abdelmohsen, U. R., Bayer, K., y Hentschel, U. (2014) Diversity, abundance and natural products of marine sponge-associated actinomycetes. *Nat. Prod. Rep.*, 31, 381–399.
- Adinarayana, G., Venkateshan, M. R., Bapiraju, V. V., Sujatha, P., Premkumar, J., Ellaiah, P., y Zeeck, A. (2006) Cytotoxic compounds from the marine actinobacterium. *Bioorg. Khim.*, 32, 328–334.
- Alcantar-Curiel, D., Tinoco, J. C., Gayosso, C., Carlos, A., Daza, C., y Perez-Prado M. C. (2004) Nosocomial bacteremia and urinary tract infections caused by extended-spectrum beta -lactamase-producing *Klebsiella pneumonia* with plasmids carrying both SHV-5 and TLA-1 genes. *Clin Infect Dis*; 38(8):1067-1074.
- Alexandra, M. C. R. (1997) Regulation of glucose metabolism in the Actinomycetes *Amycolyptopsis methanolica* and *Streptomyces coelicolor* A3. PHD thesis, University of Groningen, Germany.
- Al-Tai, A. M. y Ruan, J. S. (1994) *Nocardiosis halophila* sp. nov., a new halophilic actinomycete isolated from soil, *Int J Syst Bacteriol* 44, 474±478.
- Anderson, A. S, Wellington, E. M. H. (2001) The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int J 361 Syst Evol Microbiol* 51:797–814.
- Andrews, J. M. (2001) Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48:5-16.
- Arai, T. y Mikami, Y. (1972) Chromogenecity of *Streptomyces*. *Appl. Microbiol.*, 23, 402–406.
- ATCC. (1991) Preservation Methods: Freezing and Freeze Drying. Ed. F. P. Simione y E. M. Brown, American Type Culture Collection, Rockville, Maryland.
- Atta-ur-Rahman, M., Iqbal, C., y William, J. T. (2001) Bioassay Techniques for Drug Development, Taylor & Francis. Pág. 32-34.
- Aucoin, D. (2000) Antimicrobial Reference Guide to Effective Treatment, North American Compendiums Inc., 2da edición, Greene, W. B. Saunders Ed. Estados Unidos. Pág. 60-78.
- Baltz, R. H. (2006) Marcel Faber Roundtable: is our antibiotic pipeline unproductive because of starvation, constipation or lack of inspiration? *J Ind Microbiol Biotechnol* 33:507–513.
- Becerril-Espinosa, A. (2011) Actinobacterias aisladas del sedimento marino del Golfo de California y de Bahía Todos Santos: Diversidad, Bioactividad y Dominios Cetosintetasa. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Baja California.
- Berdy, J. (2005) Bioactivemicrobial metabolites. *J Antibiot (Tokyo)* 58:1–26.
- Bernan, V. S., Montenegro, D. A., Maiese, W. M., Steinberg, D. A., y Greenstein, M. (1994) Bioxalomycins, new antibiotics produced by the marine *Streptomyces* sp. LL-31F508: taxonomy and fermentation. *J. Antibiot.*, 47, 1417–1424.
- Biabani, M.A., Laatsch, H., Helmke, E., y Weyland, H. (1997) delta-Indomycinone: a new member of pluramycin class of antibiotics isolated from marine *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.*, 50, 874–877.

- Bian, J., Li, Y., Wang, J., Song, F. H., Liu, M., Dai, H. Q., Ren, B., Gao, H., Hu, X., Liu, Z. H., Li, W. J., y Zhang, L. X. (2009) *Amycolatopsis marina* sp. nov., an Actinomycete isolated from an ocean sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:477–481.
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Hu, W. P., Munro, M. H. G., Northcote, P. T., y Prinsep, M. R. (2007) Marine Natural Products. *Nat. Prod. Rep.*, 24-31.
- Boudjelal, F., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., y Sabaou, S. (2011a) Taxonomy study and partial characterization of antimicrobial compounds from a moderately halophilic strain of the genus *Actinoalloteichus*. *Brazilian Journal of Microbiology* 42: 835-845.
- Boudjelal, F., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., y Sabaou, S. (2011b) Taxonomy and antimicrobial activities of two novel halophilic *Saccharomonospora* strains isolated in Algerian Sahara soils. *Ann. Microbiol.* 61:299–305.
- Bredholdt, H., Galatenko, O. A., Engelhardt, K., Fjaervik, E., Terekhova, L. P., Zotchev, S. B. (2007) Rare Actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity. *Environ Microbiol* 9:2756–2764.
- Bredholt, H., Galatenko, O., Engelhardt, K., Fjaervik, E., Terekhova, L., y Zotchev, S. (2007). Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity. *EnvironMicrobiol.* 9(11): 2756-2764.
- Buchanan, G. O., Williams, P. G., Feling, R. H., Kauffman, C.A., Jensen, P.R., y Fenical, W. (2005) Sporolides A and B: structurally unprecedented halogenated macrolides from the marine actinomycete *Salinispora tropica*. *Org. Lett.*, 7, 2731–2734.
- Bull, A. T., Stach, J. E. M., Ward, A. C., y Goodfellow, M. (2005) Marine Actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87, 65–79.
- Butler, M. J. y Day, A. W. (1998) Fungal melanins: a review. *Can. J. Microbiol.*, 44, 1115–1136.
- Cai, Y. (2009) Classification and salt-tolerance of actinomycetes in the Qinghai lake water and lakeside saline soil. *J. Sustain. Develop.*, 2: 107-110.
- Capon, R. J., Skene, C., Lacey, E., Gill, J. H., Wicker, J., Heiland, K., y Friedel, T. (2000) Lorneamides A and B: two new aromatic amides from a southern Australian marine actinomycete. *J. Nat. Prod.*, 63, 1682–1683.
- Cavalieri, S. J., et al. (2005) Manual of antimicrobial susceptibility testing. Marie B. Coyle, Ed. American Society for Microbiology. E. U. A., Pág. 63-72.
- Charan, R. D., Schlingmann, G., Janso, J., Bernan, V., Feng, X., y Carter, G. T. (2004) Diazepinomicin, a new antimicrobial alkaloid from a marine *Micromonospora* sp. *J. Nat. Prod.*, 67, 1431–1433.
- Chen, Y. G., Wang, Y. X., Zhang, Y. Q., Tang, S. K., Liu, Z. X., Xiao, H. D., Xu, L. H., Cui, X. L., y Li, W. J. (2009) *Nocardiopsis litoralis* sp. nov., a halophilic marine Actinomycete isolated from a sea anemone. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:2708–2713.
- Cho, J. Y., Williams, P. G., Kwon, H. C., et al., (2007) Lucentamycins A-D, cytotoxic peptides from the marine-derived actinomycete *Nocardiopsis lucentensis*. *Natural Products*, 70: 1321–1328.

- Cho, S. H., Hwang, C. W., Chung, H. K., y Yang, C. S. (1994) A new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22, 561–563.
- Clancy, C. M. R. y Simon, J. D. (2001) Ultrastructural organization of eumelanin from *Sepia officinalis* measured by atomic force microscopy. *Biochemistry*, 40, 13353–13360.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2006) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Seventh Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute document M7-A7 Pennsylvania, USA.
- Colquhoun, J. A., Mexson, J., Goodfellow, M., Ward, A. C., Horikoshi, K., y Bull, A. T. (1998) Novel *rhodococci* and other mycolate actinomycetes from the deep sea. *Antonie Van Leeuwenhoek* 74: 27–40.
- Dastager, S. G., Li, W. J., Dayanand, A., Tang, S. K., Tian, X. P., Zhi, X. Y., Xu, L. H., y Jiang, C. L. (2006) Separation, identification and analysis of pigment (melanin) production in *Streptomyces*. *Afr. J. Biotechnol.*, 5 (8), 1131–1134.
- Demain, A. L. (1998) Induction of microbial secondary metabolism. *Inernatl. Microbio.*, 1:259–264.
- Donia, M., y Hamann, M. T. (2003) Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *Lancet Infect. Dis.*, 3, 338–348.
- Dolak, L. A., Castle, T. M., y Laborde, A. L. (1980) 3-thehalosamine, A new disaccharide antibiotic. *The Journal of Antibiotics*. Pag. 690-694.
- Dreser, A., Wirtz, V. J., Corbett, K. K., y Echániz, G. (2008) Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. *Salud Publica Mex.*; 50 supl 4:S480-S487.
- Duncan, K. (2013) Investigating bacterial diversity employing a bTEFAP approach resulting in isolation and characterization of an actinomycete library from Atlantic Canada for antimicrobial and anticancer drug discovery. PhD Tesis, Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad de la Isla del Príncipe Eduardo, Canadá, Pág. 84-96.
- Engelhardt, K., Degnes, K. F., Kemmler, M., Bredholt, H., Fjærvik, E., Klinkenberg, G., Sletta, H., Ellingsen, T. E., y Zotchev, S. B. (2010) Production of a New Thiopeptide Antibiotic, TP-1161, by a Marine *Nocardioopsis* Species. *Appl. Environ. Microbiol.* vol. 76 no. 15 4969-4976.
- Ensign, J. C. (1978) Formation, properties, and germination of actinomycete spores. *Ann. Rev. Microbiol.* 32: 185-219.
- Fenical, W., Jensen, P.R., Palladino, M. A., Lam, K. S., Lloyd, G. K., Potts, B. C. (2009) Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 17: 2175-2180.
- Fernández, L. F. G., Reyes, F., y Puelles, J. M. S. (2002) The marine pharmacy: new antitumor compounds from the sea. *Pharmaceut. News*, 9, 495–501.
- Fu, P., Wang, S., Hong, K., Li, X., Liu, P., Wang, Y., y Zhu, W. (2011a) Cytotoxic bipyridines from the marine-derived Actinomycete *Actinoalloteichus cyanogriseus* WH1-2216-6. *J Nat Prod* 74:1751–1756.
- Fu, P., Liu, P., Li, X., Wang, Y., Wang, S., Hong, K., y Zhu, W. (2011b) Cyclic Bipyridine Glycosides from the Marine-Derived Actinomycete *Actinoalloteichus cyanogriseus* WH1-2216-6. *Organic Letters* Vol. 13, No. 22 5948–5951.

- Georis, J., Giannotta, F., DeBuyl, E., Granier, B., y Frere, J. (2000) Purification and properties of three endobeta-1,4-xylanases produced by *Streptomyces* sp. strain S38 which differ in their capacity to enhance the bleaching of kraft pulp. *Enzyme Microb. Technol.*, 26, 177–183.
- Ghai, R., McMahon, K. D., y Rodríguez-Valera, F. (2012) Breaking a paradigm: cosmopolitan and abundant freshwater actinobacteria are low GC. *Environmental Microbiology Reports* 4 (1): 29–35.
- Gontang, E. A., Fenical, W., y Jensen, P. R. (2007) Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 3272-3282.
- Gontang, E. A., Gaudêncio, S. P., Fenical, W., y Jensen, P. R. (2010) Sequence-based analysis of secondary metabolite biosynthesis in marine actinobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:2487-2499.
- Goodfellow, M. y Williams, S. T. (1983) Ecology of actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.*, 37, 189–216.
- Gu, T. (2000) Liquid-Liquid Partitioning Methods for Bioseparations en *Handbook of Bioseparations*, A. Ahuja, Ed., Academic Press, New York, Vol. 2, p. 329-364.
- Guillen, G.; Valdes, M.; Liao, J.; y Hirsch, A., (1993) Identification of Actinobacteria isolated from nodules of Casuarina, by traditional and molecular techniques. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 35(2): 195-200.
- Hames-Kocabas, E. E., y Uzel., A. (2012) Isolation strategies of marine-derived actinomycetes from sponge and sediment samples. *Journal of Microbiological Methods* 88:342–347.
- Haste, N. M., Perera, V., Maloney, K. N., Tran, D. N., Jensen, P. R., y Fenical. W. (2010) Activity of the streptogramin antibiotic etamycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antibiot*, 63(5):219–224.
- Hayakawa, M. y Nonomura, H. (1987a) Humic acid–vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J. Ferment. Technol.*, 65, 501–509.
- Hayakawa, M. y Nonomura, H. (1987b) Efficacy of artificial humic acid as a selective nutrient in HVagar used for the isolation of soil actinomycetes. *J. Ferment. Technol.*, 65, 609–616.
- Hayakawa, M., Sadaka, T., Kajiura, T., y Nonomura, H. (1991) New methods for the highly selective isolation of *Micromonospora* and *Micronbispora*. *J. Ferment. Technol.*, 72, 320–326.
- Helmke, E., y Weyland, H. (1984) *Rhodococcus marinonascens* sp. nov., an actinomycete from the sea. *Int J Syst Bacteriol* 34: 127–138.
- Horinouchi, S. (2002) A microbial hormone, A-FACTOR, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. Departamento de Biotecnología, Escuela de Agricultura y Ciencias de la vida, Universidad de Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japón. *Frontiers in Bioscience* 7, 2045-2057.
- Hortal, M., Lovgren, M. de la Hoz F., Agudelo, C. I., Brandileone, M. C., y Camou, T. (2001) Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* in six Latin American countries: 1993-1999 surveillance. *Microb Drug Resist*, :391-401.
- Hozzein, W. N., y 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.

- Imada, C., Koseki, N., Kamata, M., Kobayashi, T., y Hamada-Sato, N. (2007) Isolation and characterization of antibacterial substances produced by marine actinomycetes in the presence of seawater. *Actinomycetologica*; 21: 27-31.
- Imade, C. (2005) Enzyme inhibitors and other bioactive compounds from marine actinomycetes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 587, 59–63.
- INEGI (2014) Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero). Recuperado: 22 febrero 2014, de: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2014/cancer0.pdf>.
- Janda, J. M., y Abbott, S. L. (2007) 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol* 45: 2761–2764.
- Jensen, J., Bohonak, A., y Kelley, S. (2005) Isolation by distance, web service. *BMC Genet* 6: 13.
- Jensen, M. A., Webster, J.A., y Straus, N. (1993) Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl Environ Microbiol* 59: 945–952.
- Jensen, P. R. (2010). Linking species concepts to natural product discovery in the post-genomic era. *J Ind Microbiol Biotech.* 37:219-224.
- Jensen, P. R. y Fenical, W. (1994) Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 48: 559-584
- Jensen, P. R., Dwight, R., y Fenical, W. (1991) Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 57: 1102–1108.
- Jensen, P. R., Gontang, E., Mafnas, C., Mincer, T. J., y Fenical, W. (2005a) Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environ. Microbiol.*, 7: 1039–1048.
- Jensen, P. R., Mincer, T. J., Williams, P. G., y Fenical, W. (2005b) Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie van Leeuwenhoek* 87: 43–48.
- Jensen, P. R., Williams, P. G., Oh, D. C., Zeigler, L., y Fenical, W. (2007) Species-specific secondary metabolite production in marine actinomycetes of the genus *Salinispora*. *Appl Environ Microbiol* 73: 1146–1152.
- Jensen, P. R., y Lauro, F. M. (2008) An assessment of actinobacterial diversity in the marine environment. *Antonie van Leeuwenhoek* 94:51–62.
- Jensen, P. R., y Mafnas, C. (2006) Biogeography of the marine actinomycete *Salinispora*. *Environ Microbiol* 8: 1881–1888.
- Jeong, S. Y., Shin, H. J., Kim, T. S., Lee, H. S., Park, S. K., y Kim, H. M. (2006) Streptokordin, a new cytotoxic compound of the methylpyridine class from a marine-derived *Streptomyces* sp. KORDI-3238. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 59, 234–240.
- Jiang, C. L., y Xu, L. H. (1996) Diversity of soil Actinomycetes in Yunnan, China. *Appl Environ Microbiol* 62:244–248.
- Jiang, Y., Li, W. J., Xu, P., Tang, S. K., y Xu, L. H. (2006) Study on Actinomycete diversity under salt and alkaline environments. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 46:191–195.
- Karanja, E. N. (2012) Growth Characteristics, Enzyme Activity and Production of Secondary Metabolites from Selected Novel *Streptomyces* Isolates from Kenyan

- Soils. Tesis de PhD, en Graduate School of Engineering Kochi University of Technology Kochi, Japón.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., y Cheung, M. (2012) Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647–1649.
- Kerrigan, Liz. (2007) *Pharmaceutical Microbiology Forum Newsletter*, Vol. 13. Scott Sutton ed. Pag. 2-6.
- Khan, S. T., Takagi, M., y Shin-ya, K. (2010) Diversity, Salt Requirement, and Antibiotic Production of Actinobacteria Isolated from Marine Sponges. *Nota Actinomycetologica*. Vol. 24-1, Pág. 18-23.
- Kim, C. J., Lee, K. H., Shimazu, A., Kwon, O. S., y Park, D. J. (1995) Isolation of rare actinomycetes from various types of soil. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23, 36–42.
- Kim, J. W.; Adachi, H.; Shin-ya, K.; Hayakawa, Y.; Seto, H. (1997) Apoptolidin, a new apoptosis inducer in transformed cells from *Nocardiopsis* sp. *J. Antibiot.*, 50, 628–630.
- Kim, S. H., Yang, H. O., Sohn, Y. C., y Kwon, H. C. (2010) *Aeromicrobium halocynthiae* sp. nov., a taurocholic acid-producing bacterium isolated from the marine ascidian *Halocynthia roretzi*. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:2793–2798.
- Kim, T. K., Hewavitharana, A. K., Shaw, P. N., y Fuerst, J. A. (2006) Discovery of a new source of rifamycin antibiotics in marine sponge actinobacteria by phylogenetic prediction. *Appl Environ Microbiol* 72:2118–2125.
- Kokare, C. R., Mahadik, K. R., Kadam, S. S., Chopade, B. A. (2004) Isolation, characterization and antimicrobial activity of marine halophilic *actinopolyspora* species AH1 from the west coast of India. *Curr. Sci.* 86:593-597.
- Kroppenstedt, R. M. (1992). The genus *Nocardiopsis*, en *The Prokaryotes*. Eds. A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder y K. H. Schleifer. New York: Springer. pp. 1139:1156.
- Kurtböke, D. I. (2012) Biodiscovery from rare Actinomycetes: an ecotaxonomical perspective. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:1843–1852.
- Lam, K. S. (2006) Discovery of novel metabolites from marine Actinomycetes. *Curr Opin Microbiol* 9:245–251.
- Lam, S. K. (2006) Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Curr. Opin. Microbiol.*, 9, 245–251.
- Lang, S., Beli, W., Tokuda, H., Wicke, C., y Lurtz, V. (2004) Improved production of bioactive glycosylmannosyl-glycerolipid by sponge associated *Microbacterium* species. *Mar Biotechnol.*, 6, 152–156.
- Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G., y Marinelli, F. (2000) Rare genera of *actinomycetes* as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek* 78: 399–405.
- Li, F., Maskev, R. P., Qin, S., Sattler, I., Fiebig, H. H., Maier, A., Zeeck, A., y Laatsch, H. (2005) Chinikomycins A and B: isolation, structure elucidation and biological activity of novel antibiotics from a marine *Streptomyces* sp. isolate M045. *J. Nat. Prod.*, 68, 349–353.
- Li, J., Yang, J., Zhu, W. Y., He, J., Tian, X. P., Xie, Q., Zhang, S., Y Li, W. J. (2012) *Nocardiopsis coralliicola* sp. nov., isolated from the gorgonian coral, *Menella praelonga*. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:1653–1658.

- Li, W. J.; Kroppenstedt, R. M.; Wang, D.; Tang, S. K.; Lee, J. C.; Park, D. J.; Kim, C. J.; Xu, L. H.; Jiang, C. L. Five novel species of the genus *Nocardiopsis* isolated from hypersaline soils and emended description of *Nocardiopsis salina* Li *et al.* 2004. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006, 56, 1089–1096.
- Lin, W. P., Lai, H. L., Liu, Y. L., Chiung, Y. M., Shiau, C. Y., Han, J. M., Yang, C. M., y Liu, Y. T. (2005) Effect of melanin produced by a recombinant *Escherichia coli* on antibacterial activity of antibiotics. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 38, 320–326.
- Lingappa, Y., y Lockwood, J. L. (1961) A Chitin Medium for Isolation, Growth and Maintenance of Actinomycetes. *Nature* 189, 158-159.
- Liu, R., Cui, C. B., Duan, L., Gu, Q. Q., y Zhu, W. M. (2005) Potent in vitro anticancer activity of metacycloprodigiosin and undecyprodigiosin from a sponge-derived actinomycete *Saccharopolyspora sp. nov.* *Arch. Pharm. Res.*, 28, 1641–1344.
- Lombo, F., Velasco, A., de la Calle, F., Brana, A. F., Sánchez- Pulles, J. M., Méndez, C., y Sálas, J. A. (2006) Deciphering the biosynthesis of the antitumor thiocoraline from a marine actinomycetes and its expression in two *Streptomyces* species. *ChemBioChem*, 7, 366–376.
- Magarvey, N. A., Keller, J. M., Bernan, V., Dworkin, M. y Sherman, D. H. (2004) Isolation and Characterization of Novel Marine-Derived Actinomycete Taxa Rich in Bioactive Metabolites. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 70:12. p. 7520–7529.
- Mahyudin, N. A. (2008) Actinomycetes and fungi associated with marine invertebrates: a potential source of bioactive compounds. Tesis Doctor en Filosofía en Microbiología. Universidad de Canterbury, Nueva Zelanda.
- Maldonado, L. A., Fenical, W., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., Mincer, T.J., Bull, A. T., Ward, A. C., y 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.
- Maldonado, L. A., Fragoso-Yanez, D., Perez-Garcia, A., Rosellon-Druker, J., y Quintana, E. (2009) Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico. *Antonie Van Leeuwenhoek* 95: 111–120.
- Maloney, K. N., MacMillan, J. B., Kauffman, C. A., Jensen, P. R., DiPasquale, A. G., Rheingold, A. L., y Fenical, W. (2009) Lodopyridone, a structurally unprecedented alkaloid from a marine Actinomycete. *Org Lett* 11: 5422–5424.
- Manam, R. R., Teisan, S., White, D. J., Nicholson, B., Grodberg, J., Neuteboom, S. T., Lam, K. S., Mosca, D. A., Lloyd, G. K., y Potts, B. C. (2005) Lajollamycin, a nitro-tetraene spiro-betalactone-gamma-lactam antibiotic from the marine actinomycetes *Streptomyces nodosus*. *J. Nat. Prod.*, 68, 240–243.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J. y Kim, S. K. (2013) Introduction to Marine Actinobacteria, in *Marine Microbiology: Bioactive Compounds and Biotechnological Applications* (ed S.-K. Kim), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. Pags. 5-12.
- Maskey, R. P., Halmke, E., Kayser, O., Fiebig, H. H., Maier, A., Busche, A., y Laatsch, H. (2004) Anticancer and antibacterial trioxacarcins with antimalarial activity from a marine *streptomyces* and their absolute stereochemistry. *J. Nat. Prod.*, 57, 771–779.
- Maskey, R. P., Helmke, E., Fiebig, H. H., y Laatsch, H. (2002) Parimycin: isolation and structure elucidation of a novel cytotoxic 2,3-dihydroquinizarin analogue of

- gamma-indomycinone from a marine *streptomycete* isolate. *J. Antibiot.*, 55, 1031–1035.
- Maskey, R. P., Helmke, E., y Laastsch, H. (2003) Himalomycin A and B: isolation and structure elucidation of new fridamycin type antibiotics from a marine *Streptomyces* isolate. *J. Antibiot.*, 56, 942–949.
- Matrus, L., y Wheeler, T. (2001) *Microbiology Guide to Interpreting MIC (Minimum Inhibitory Concentration)*. IDEXX Laboratories Ltd. E. U. A., Pags. 1-4.
- Meiying, Z., y Zhicheng, Z. (1998) Identification of marine actinomycetes S-216 strain and its biosynthetic conditions of antifungal antibiotic. *J. Xiamen Univ. Nat. Sci.*, 37, 109–114.
- Meklat, A., Sabaou, N., Zitouni, A., Mathieu, F., y Lebrihi, A. (2011) Isolation, taxonomy, and antagonistic properties of halophilic Actinomycetes in Saharan soils of Algeria. *Appl Environ Microbiol* 77:6710–6714.
- Meklat, A., Sabaou, N., Zitouni, A., Mathieu, F., y Lebrihi, A. (2011) Isolation, taxonomy, and antagonistic properties of halophilic Actinomycetes in Saharan soils of Algeria. *Appl Environ Microbiol* 77:6710–6714.
- Mincer, T. J., Fenical, W., y Jensen, P. R. (2005) Culture-dependent and culture independent diversity within the obligate marine actinomycete genus *Salinispora*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 7019–7028.
- Mincer, T. J., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., y Fenical, W. (2002) Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycetes taxon in ocean sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 5005–5011.
- Miyadoh, S., (1993) Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: a producing microorganism approach. *Actinomycetologica* 7:100–106.
- Moran, M. A., Rutherford, L. T., y Hodson, R. E. (1995) Evidence for indigenous *Streptomyces* populations in a marine environment determined with a 16S rRNA probe. *Appl Environ Microbiol* 61: 3695–3700.
- Moyer, A. J., y Coghill, R. D. (1946). Penicillin VIII: Production of penicillin in surface cultures. *J. Bacteriol.* 51:57-78.
- Nakashima, T., Sato, E., Niwano, Y., Kohno, M., Muraoka, W., y Oda, T. (2007) Inhibitory or scavenging action of ketoconazole and ciclopiroxolamine against reactive oxygen species released by primed inflammatory cells. *Br. J. Dermatol.*, 156, 720–727.
- Nolan, R. D., y Cross, T. (1988) Isolation and screening of Actinomycetes. In: Goodfellow M, Williams ST, Mordarski M (eds) *Actinomycetes in biotechnology*. Academic, London, pp 2–8.
- Nonomura, H. (1988) Isolation, taxonomy and ecology of soil actinomycetes. *Actinomycetologica*, 3, 45–54.
- Oh, Dong-Chan., Williams, P. G, Kauffman, C. A, Jensen, P. R, y Fenical, W. (2006) Cyanosporasides A and B, Chloro- and Cyano-cyclopenta[a]indene Glycosides from the Marine Actinomycete "*Salinispora pacifica*". *Org. Lett.*, 8 (6), 1021-1024.
- Okami, Y., Okazaki, T., Kitahara, T., y Umezawa, H. (1976) A new antibiotic apasmomycin, produced by a streptomycete isolated from shallow sea mud. *J. Antibiot.*, 28, 176–184.
- Organización Panamericana de la Salud [OPS]. (2013) El cáncer en las Américas. Recuperado el 22 de enero de 2014, de:

- http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=292%3Acancer&catid=1866%3Ahsd0201a-cancer-home&Itemid=3855&lang=es.
- Pandey, A., Shukla, A., y Majumdar, S. K. (2005) Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces kanamyceticus* M 27 for the production of an antibacterial antibiotic. *Afr. J. Biotechnol.*, 4 (9), 909–910.
- Pimentel-Elardo, S. M., Tiro, L. P., Grozdanov, L. y Hentschel, U. (2008) *Saccharopolyspora cebuensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a Philippine sponge (Porifera). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58:628-632.
- Procópio, R. E. de L., Silva, I. R. da, Martins, M. K., Azevedo, J. L. de, y Araújo, J. M. de. (2012) Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16(5), 466-471.
- Qin S., Li J., Chen H. H., Zhao G. Z., Zhu W. Y., Jiang C. L., *et al.* (2009). Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6176–6186.
- Quiñones-Falconi, F., Calva, J. J., Lopez-Vidal, Y., Galicia-Velazco, M., Jimenez-Martinez, y M. Larios Mondragon, L. (2004) Antimicrobial susceptibility patterns of *Streptococcus pneumoniae* en México. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 49:53-58.
- Raju, R., Piggott, A. M., Conte, M.; Tnimov, Z.; Alexandrov, K.; Capon, R. J. (2010) Nocardiopsins: New FKBP12-binding macrolide polyketides from an Australian marine-derived actinomycete, *Nocardiopsis* sp. *Chem. Eur. J.*, 16, 3194–3200
- Rohm y Haas Company. (2000) Polymeric Adsorbents, Amberlite XAD. Francia.
- Sahu, M. K., Murugan, M., Sivakumar, K., Thangaradjou, T., y Kannan, L. (2007) Occurrence and distribution of actinomycetes in marine environs and their antagonistic activity against bacteria that is pathogenic to shrimps. *Isr. J. Aquacult. Bamid.*, 59 (3), 155–161.
- Secretaría de Salud, Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud. (2013) Los 5 tipos de cáncer que más afectan a mexicanos. Recuperado el 2 de marzo de 2014, de: <http://www.spps.salud.gob.mx/noticias/1445-5-tipos-cancer-mas-afectan-mexicanos.html>.
- Silva, J., Gatica, R., Aguilar, C., Becerra, Z., Garza-Ramos, U., y Velázquez, M. (2001) Outbreak of infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican hospital. *J Clin Microbiol* ;39:3193-3196.
- Simione, F. P. (2006) Cyropreservation Technical Manual, Nunc International, Rochester, New York.
- Singla, A. K.; Agrewala, J. N.; Vohra, R. M.; y Singh, J. R. (2007) World Patent WO 2007/031832.
- Sivakumar, K. (2001) Actinomycetes of an Indian mangrove (Pichavaram) environment: an inventory, PhD Thesis, Annamalai University, India, p. 91.
- Sola-Landa, A., Moura, R. S. y Martin, J. F. (2003) The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, pp 6133–6138.
- Soria-Mercado, I. E., Prieto-Davo, A., Jensen, P. R., y Fenical, W. (2005) Antibiotic terpenoid chlorodihydroquinones from a new marine actinomycete. *J. Nat. Prod.*, 68, 904 910.

- Stach, J. E. M., Maldonado, L. A., Ward, A. C., Bull, A. T., y Goodfellow, M. (2004) *Williamsia maris* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the Sea of Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54,191–194.
- Stach, J. E. M., Maldonado, L. A., Ward, A. C., Goodfellow, M., y Bull, A. T. (2003) New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. *Environ Microbiol* 5:828–841.
- Stach, J. E. M., y Bull, A. T. (2005) Estimating and comparing the diversity of marine Actinobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 87:3–9.
- Stritzke, K., Schulz, S., Laatsch, H., Helmke, E., y Beil, W. (2004) Novel caprolactones from a marine streptomycete. *J. Nat. Prod.*, 67, 395–401.
- Subramani, R., y Aalbersberg, W. (2012) Marine Actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiol Res* 167:571–580.
- Subramani, R., y Aalbersberg, W. (2013) Culturable rare Actinomycetes: diversity, isolation and marine natural product discovery. *Appl Microbiol Biotechnol.* (21):9291-321.
- Tae, K. K., Garson, M. J., y Fuerst, J. A. (2005) Marine actinomycetes related to the 'Salinospora' group from the Great Barrier Reef sponge *Pseudoceratina clavata*. *Environ. Microbiol.*, 7 (4), 509–518.
- Takizawa, M., Colwell, R. A., y Hill, R. (1993) Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol* 59: 997–1002.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., y Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Tanaka, S., Fujita, Y., Parry, H. E., Yoshizawa, A. C., Morimoto, K., Murase, M., Yamada, Y., Yao, J., Utsunomiya, S., Kajihara, S., Fukuda, M., Ikawa, M., Tabata, T., Takahashi, K., Aoshima, K., Nihei, Y., Nishioka, T., Oda, Y., y Tanaka, K. (2014) Mass++: A Visualization and Analysis Tool for Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.*
- Tanasupawat, S., Jongrungruangchok, S., y Kudo, T. (2010) *Micromonospora marina* sp. nov., isolated from sea sand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 648–652.
- Tang, Y. W., Ellis, N. M., Hopkins, M. K., Smith, D. H., Dodge, D. E., y Persing, D. H. (1998) Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual aerobic pathogenic Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 36, 3674–3679.
- Tian, X. P., Xu, Y., Zhang, J., Li, J., Chen, Z., Kim, C., Li, W., Zhang, C., y Zhang, S. (2012) *Streptomyces oceani* sp. nov., a new obligate marine actinomycete isolated from a deep-sea sample of seep authigenic carbonate nodule in South China Sea. *Antonie van Leeuwenhoek* 102:335–343.
- Tian, S., Pu, X., Luo, G., Zhao, L., Xu, L., Li, W., y Luo, Y. (2013) Isolation and Characterization of New p-Terphenyls with Antifungal, Antibacterial, and Antioxidant Activities from Halophilic Actinomycete *Nocardiopsis gilva* YIM 90087. *J. Agric. Food Chem.* 61, 3006–3012.
- Tiwari, K., y Gupta, R. K. (2012) Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2012; 32(2): 108–132.
- Tsujibo, H., Sakamoto, T., Miyamoto, K., Kusano, G., Ogura, M., Hasegawa, T., y Inamori, Y. (1990) Isolation of cytotoxic substance, kalafungin from an

- alkalophilic actinomycete, *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *prasina*. Chem Pharm Bull 38(8):2299-300.
- Udway, D. W., Gontang, E. A., Jones, A. C., Jones, C. S., Schultz, A. W., Winter, J. M., Yang, J. Y., Beauchemin, N., Capson, T. L., Clark, B. R., Esquenazi, E., Eustáquio, A. S., Freel, K., Gerwick, L., Gerwick, W. H., Gonzalez, D., Liu, W. T., Malloy, K. L., Maloney, K. N., Nett, M., Nunnery, J. K., Penn, K., Prieto-Davo, A., Simmons, T. L., Weitz, S., Wilson, M. C., Tisa, L. S., Dorrestein, P. C., y Moore, B. S. (2011) Significant natural product biosynthetic potential of actinorhizal symbionts of the genus *Frankia*, as revealed by comparative genomic and proteomic analyses. Appl Environ Microbiol 77(11):3617–3625.
- Velázquez-Meza, M., Aires de Sousa, M., Echaniz-Avilez, G., Solórzano- Santos, F., Miranda-Navales, G., y Silva-Sánchez, J. (2004) Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a pediatric hospital in Mexico City during a 7-year period (1997 to 2003): clonal evolution and impact of infection control. J Clin Microbiol ;42:3877-3880.
- Verma, V. C., Anand, S., Ulrichs, C., y Singh, S. K. (2013) Biogenic gold nanotriangles from *Saccharomonospora* sp., an endophytic actinomycetes of *Azadirachta indica* A. Juss. International Nano Letters, 3:21.
- Vigal, T., Gil, J. F., Daza, A., García- González, M. D., y Martin, J. F. (1991) Cloning characterization and expression of an alpha amylase gene from *Streptomyces griseus* IMRU 3570. Mol. Gen. Genet., 225, 278–288.
- Villarreal-Gómez, L. J., Soria-Mercado, I. E., Guerra-Rivas, G. y Ayala-Sánchez, N. E. (2010) Actividad anticancerígena y antibacteriana de macroalgas y bacterias asociadas a su superficie. Revista de Biología Marina y Oceanografía, Vol. 45, N°2: 267-275.
- Wender, P. A.; Longcore, K. E. (2009) Apoptolidins E and F, new glycosylated macrolactones isolated from *Nocardiopsis* sp. Org. Lett., 11, 5474–5477-
- Weyland, H. (1969) Actinomycetes in North Sea and Atlantic Ocean sediments. Nature, 223, 858.
- Williams, S. T., y Wellington, E. M. H. (1982) Principles and problems of selective isolation of microbes. En: Bullock, J. D., Nisbet, L. J., y Winstanley, D. J. (eds) Bioactive microbial products I: search and discovery. Academic, London, pp 9–26
- Woo, J. H., Kitamura, E., Myouga, H., y Kamei, Y. (2002) An antifungal protein from the marine bacterium *Streptomyces* sp. strain AP77 is specific for *Pythium porphyrae*, a causative agent of red rot disease in *Porphyra* spp. Appl. Environ. Microbiol., 68, 2666–2675.
- Wu, H., Chen, W., Wang, G., Dai, S., Zhou, D., Zhao, H., Guo, Y., Ouyang, Y. C., y Li, X. (2012) Culture-dependent diversity of Actinobacteria associated with seagrass (*Thalassia hemprichii*). African J Microbiol Res 6: 87–94.
- Yassin, A. F., Galinski, E. A., Wohlfarth, A., Jahnke, K. D., Schaal, K. P. y Trueper, H. G. (1993) A new actinomycete species, *Nocardiopsis lucentensis* sp. nov, Int J Syst Bacteriol 43, 266-271.
- Yassin, A. F., Rainey, F. A., Burghardt, J., Gierth, D., Ungerechts, J., Lux, I., Seifert, P., Bal, C. y Schaal, K. P. (1997) Description of *Nocardiopsis synnemataformans* sp. nov., elevation of *Nocardiopsis alba* subsp. *prasina* to *Nocardiopsis prasina* comb. nov., and designation of *Nocardiopsis antarctica* and *Nocardiopsis*

- alborubida* as later subjective synonyms of *Nocardiopsis dassonvillei*, Int J Syst Bacteriol 47, 983-988.
- Yu, L., Lai, Q., Yi, Z., Zhang, L., Huang, Y., Gu, L., y Tang, X. (2013) *Microbacterium sediminis* sp. nov., a psychrotolerant, thermotolerant, halotolerant and alkalitolerant Actinomycete isolated from deep-sea sediment. Int J Syst Evol Microbiol 63:25–30
- Yuan, M., Yu, Y., Li, H. R., Dong, N., y Zhang, X. H. (2014) Phylogenetic diversity and biological activity of actinobacteria isolated from the Chukchi Shelf marine sediments in the Arctic Ocean. Mar. Drugs;12(3):1281-97.
- Zhang, L., Xi, L., Ruan, J., y Huang, Y. (2012) *Micromonospora yangpuensis* sp. nov., isolated from a sponge. Int J Syst Evol Microbiol 62:272–278
- Zhang, Q., Li, S., Chen, Y., Tian, X., Zhang, H., Zhang, G., Zhu, Y., Zhang, S., Zhang, W., y Zhang, C. (2013) New diketopiperazine derivatives from a deep-sea-derived *Nocardiopsis alba* SCSIO 03039. J Antibiot (Tokyo) 66:31–36.
- Zonova, G. M. (1965) Melanoid pigments of Actinomycetes. Microbiol, 34, 278–283.

ANEXO 1

ACTINOBACTERIAS DE SEDIMENTOS MARINOS DE MÉXICO.

Base de datos y árbol filogenético.

A.1. Base de datos: actinobacterias de sedimentos de México.

Cepa	Género	M. O.	Medio de aislación	Muestras de sedimento	Organismo más similar según el gen 16s ARNr (% similitud)
GC-1b	<i>Streptomyces</i>	-	M2	GC-E-20-1 302 m	<i>Streptomyces</i> sp. AMS578 (99)
GC-2b	<i>Streptomyces</i>	-	M3	GC-E-20-1 302 m	<i>Streptomyces</i> sp. 10-83 (99)
GC-3n	<i>Micromonospora</i>	-	M3	GC-E-20-1 302 m	<i>Micromonospora</i> sp. WMMB 824 (99)
GM-1b	<i>Nocardiosis</i>	-	M2G	GM-X2-E19	<i>Nocardiosis dassonvillei</i> BA6-3 (100)
GM-2n	<i>Micromonospora</i>	-	M3G	GM-X2-E36	<i>Micromonospora eburnea</i> RtlI69 (99)
GM-3n	<i>Micromonospora</i>	-	M3G	GM-X2-E24	<i>Micromonospora tulbaghia</i> UTMC 875 (100)
GM-4b	<i>Streptomyces</i>	-	M3G	GM-X2-E2	<i>Streptomyces</i> sp. TC6 (100)
GM-5n	<i>Micromonospora</i>	-	M3G	GM-X2-E19	<i>Micromonospora</i> sp. FXJ1.256 (99)
GM-6b	<i>Streptomyces</i>	-	M2G	GM-X2-E19	<i>Streptomyces massiliensis</i> AP10 (98)
GM-7b	<i>Actinophytocola</i>	-	M2G	GM-X2-E2	<i>Actinophytocola timorensis</i> (99)
GM-8b	<i>Nonomuraea</i>	-	M3G	GM-X2-E2	<i>Nonomuraea</i> sp. FXJ6.014 (95)
GM-9n	<i>Micromonospora</i>	-	M2R	GM-X2-E19	<i>Micromonospora</i> sp. PVA_121-13 (100)
GM-10n	<i>Micromonospora</i>	-	M3R	GM-X2-E36	<i>Micromonospora</i> sp. NEAU-CF28 (100)
GM-11r	<i>Astrosporangium</i>	-	M3R	GM-X2-E24	<i>Astrosporangium</i> sp. LS296 (99)
GM-12b	<i>Micromonospora</i>	-	M2R	GM-X2-E36	<i>Micromonospora pattaloongensis</i> HBUM174917 (99)
GM-13b	<i>Nonomuraea</i>	-	M3R	GM-X2-E19	<i>Nonomuraea</i> sp. R5-34 (99)
GM-14b	<i>Actinomadura</i>	-	M2R	GM-X2-E19	<i>Actinomadura</i> sp. TRM46795-55 (99)
GM-15b	<i>Nonomuraea</i>	-	M2R	GM-X2-E24	<i>Nonomuraea</i> sp. SpC090624KE_04 (100)
* PV-1b	<i>Actinoalloteichus</i>	+	M5	PV11-02-A	<i>Actinoalloteichus hymeniacidonis</i> OAct414 (99)
* PV-2b	<i>Streptomyces</i>	+	M3	PV11-06-A	<i>Streptomyces</i> sp. WMMB 367 (99)
* PV-3b	<i>Actinoalloteichus</i>	+	M5	PV11-09-A	<i>Actinoalloteichus</i> sp. SHA6 (99)
* PV-4b	<i>Actinoalloteichus</i>	+	M3	PV11-12-A	<i>Actinoalloteichus nanshanensis</i> NEAU 119
* PV-5n	<i>Salinispora</i>	+	M3	PV11-22-B	<i>Salinispora pacifica</i> AMS178 (99)
* PV-6n	<i>Salinispora</i>	+	M5	PV11-23(2D)-C	<i>Salinispora arenicola</i> AMS300 (100)
* PV-7n	<i>Salinispora</i>	+	M5	PV11-27-B	<i>Salinispora pacifica</i> AMS178 (99)
* PV-8n	<i>Salinispora</i>	+	M3	PV11-27-B	<i>Salinispora arenicola</i> AMS22 (99)
* PV-9n	<i>Salinispora</i>	+	M3	PV11-27-C	<i>Salinispora arenicola</i> CNH-996 (100)
* PV-10b	<i>Nocardiosis</i>	+	M3	PV11-29-A	<i>Nocardiosis nikkonensis</i> (100)
* PV-11n	<i>Micromonospora</i>	+	M5	PV11-31(2D)-A	<i>Micromonospora</i> sp. WMMB 414 (99)
* PV-12n	<i>Salinispora</i>	+	M5	PV11-31-B	<i>Salinispora arenicola</i> SCSIOZ-SH19 (100)
* PV-13n	<i>Salinispora</i>	+	M3	PV11-39-A	<i>Salinispora arenicola</i> AMS300 (99)
PV-14n	<i>Salinispora</i>	+	M5	PV11-02-C	<i>Salinispora pacifica</i> CNR-114
PV-15n	<i>Salinispora</i>	+	M5	PV11-07-B	<i>Salinispora arenicola</i> CNH-643
PV-16n	<i>Salinispora</i>	+	M3	PV11-08-A	<i>Salinispora arenicola</i> CNH-643
PV-17n	<i>Salinispora</i>	+	M3	PV11-08-C	<i>Salinispora pacifica</i> CNR-114

Actinobacterias raras: evaluación del potencial anticancerígeno y antibacteriano de metabolitos secundarios

Cepa	Género	M. O.	Medio de aislación	Muestras de sedimento	Organismo más similar según el gen 16s ARNr (% similitud)
PV-18n	<i>Salinispora</i>	+	M5	PV11-10-A	<i>Salinispora arenicola</i> CNH-643
PV-19n	<i>Salinispora</i>	+	M5	PV11-10-B	<i>Salinispora pacifica</i> CNR-114
PV-20n	<i>Salinispora</i>	+	M5	PV11-10-B	<i>Salinispora arenicola</i> CNH-643
PV-21n	<i>Salinispora</i>	+	M5	PV11-15-F	<i>Salinispora arenicola</i> CNH-643
PV-22n	<i>Salinispora</i>	+	M5	PV11-23(2D)-B	<i>Salinispora arenicola</i> CNH-643
PV-23n	<i>Salinispora</i>	+	M5	PV11-23(2D)-D	<i>Salinispora pacifica</i> CNR-114
PV-24n	<i>Salinispora</i>	+	M5	PV11-23-A	<i>Salinispora arenicola</i> CNH-643
PV-25n	<i>Micromonospora</i>	-	M3	PV11-11-A	<i>Micromonospora marina</i> JSM1-1
PV-26b	<i>Actinomadura</i>	-	M3	PV11-13-B	<i>Actinomadura geliboluensis</i> A8036
PV-27n	<i>Micromonospora</i>	-	M5	PV11-14-A	<i>Micromonospora maritima</i> D10-9-5
PV-28b	<i>Actinomadura</i>	-	M5	PV11-17-B	<i>Actinomadura chokoriensis</i> 3-45-a-11
PV-29n	<i>Micromonospora</i>	-	M3	PV11-20-B	<i>Micromonospora tulbaghia</i> TVU1
PV-30b	<i>Nocardiopsis</i>	-	M5	PV11-23-A	<i>Nocardiopsis umidischolae</i> 66-93
PV-31b	<i>Streptomyces</i>	-	M5	PV11-26-A	<i>Streptomyces sulphureus</i> NRRL B-1627
PV-32n	<i>Micromonospora</i>	-	M3	PV11-30-A	<i>Micromonospora sediminicola</i> SH2-13
PV-33b	<i>Verrucospora</i>	-	M3	PV11-31-C	<i>Verrucospora gifhornensis</i> DSM 44337
* V-1b	<i>Actinoalloteichus</i>	+	M3	V11-20-A	<i>Actinoalloteichus</i> sp. NPS-702 (99)
* V-2b	<i>Saccharomonospora</i>	+	M5	V11-22-C	<i>Saccharomonospora</i> sp. BCRC 16893 (99)
* V-3b	<i>Nocardiopsis</i>	+	M5	V11-7-B	<i>Nocardiopsis</i> sp. M5S8 (99)
V-4b	<i>Nocardiopsis</i>	+	M5	V11-26-A	<i>Nocardiopsis nikkonensis</i> YU1183-22
V-5n	<i>Micromonospora</i>	-	M3	V11-14-A	<i>Micromonospora echinospora</i> ATCC 15837
V-6n	<i>Micromonospora</i>	-	M5	V11-15-(2D)-B	<i>Micromonospora echinospora</i> ATCC 15837
V-7n	<i>Micromonospora</i>	-	M5	V11-15-D	<i>Micromonospora viridifaciens</i> DSM 43909
V-8n	<i>Salinispora</i>	-	M5	V11-17-C	<i>Salinispora pacifica</i> CNR-114
V-9n	<i>Micromonospora</i>	-	M5	V11-18-(2D)-A	<i>Micromonospora tulbaghia</i> TVU1
V-10n	<i>Micromonospora</i>	-	M5	V11-18-B	<i>Micromonospora sediminicola</i> SH2-13
V-11n	<i>Micromonospora</i>	-	M5	V11-20-B	<i>Micromonospora aurantiaca</i> ATCC 27029
V-12b	<i>Verrucospora</i>	-	M5	V11-23-A	<i>Verrucospora gifhornensis</i> DSM 44337
V-13r	<i>Streptosporangium</i>	-	M5	V11-24(2D)-D	<i>Streptosporangium anatoliense</i> N9999
V-14r	<i>Rhodococcus</i>	-	M5	V11-24-B	<i>Rhodococcus ruber</i> DSM 43338
V-15n	<i>Micromonospora</i>	-	M5	V11-24-D	<i>Micromonospora echinospora</i> ATCC 15837
V-16n	<i>Micromonospora</i>	-	M5	V11-25-B	<i>Micromonospora aurantiaca</i> ATCC 27029
V-17n	<i>Micromonospora</i>	-	M5	V11-28-(2D)-A	<i>Micromonospora chokoriensis</i> 2-19-6
V-18n	<i>Micromonospora</i>	-	M5	V11-30-B	<i>Micromonospora echinospora</i> ATCC 15837
V-19n	<i>Micromonospora</i>	-	M5	V11-31-(2D)-A	<i>Micromonospora schwarzwaldensis</i> HKI0641
V-20n	<i>Micromonospora</i>	-	M5	V11-31-(2D)-B	<i>Micromonospora chalcea</i> DSM 43026
Cepa	Género	M. O.	Medio de aislación	Muestras de sedimento	Organismo más similar según el gen 16s ARNr (% similitud)

Actinobacterias raras: evaluación del potencial anticancerígeno y antibacteriano de metabolitos secundarios

V-21n	<i>Micromonospora</i>	-	M5	V11-31-B	<i>Micromonospora chokoriensis</i> 2-19-6
V-22b	<i>Actinomadura</i>	-	M5	V11-32-(2D)-A	<i>Actinomadura geliboluensis</i> A8036
V-23n	<i>Micromonospora</i>	-	M5	V11-32-C	<i>Micromonospora schwarzwaldensis</i> HKI0641
V-24n	<i>Micromonospora</i>	-	M5	V11-35-E	<i>Micromonospora aurantiaca</i> ATCC 27029
V-25n	<i>Micromonospora</i>	-	M5	V11-4-(2D)-A	<i>Micromonospora echinospora</i> ATCC 15837
V-26n	<i>Micromonospora</i>	-	M5	V11-4-A	<i>Micromonospora chalcea</i> DSM 43026
V-27b	<i>Verrucosipora</i>	-	M5	V11-4-B	<i>Verrucosipora gifhornensis</i> DSM 44337
V-28b	<i>Actinoalloteichus</i>	-	M5	V11-17-B	<i>Actinoalloteichus hymeniacidonis</i> HPA177
V-29n	<i>Micromonospora</i>	-	M5	V11-19-D	<i>Micromonospora echinospora</i> ATCC 15837
V-30n	<i>Micromonospora</i>	-	M5	V11-31-E	<i>Micromonospora echinospora</i> ATCC 15837
V-31n	<i>Micromonospora</i>	-	M5	V11-31-G	<i>Micromonospora echinospora</i> ATCC 15837

GC: Golfo de California, GM: Golfo de México, PV: Puerto Vallarta, V: Veracruz.

Color predominante n: naranja; b: blanco/beige. r: rojo o rosa.

M. O: + cepas marinas obligadas.

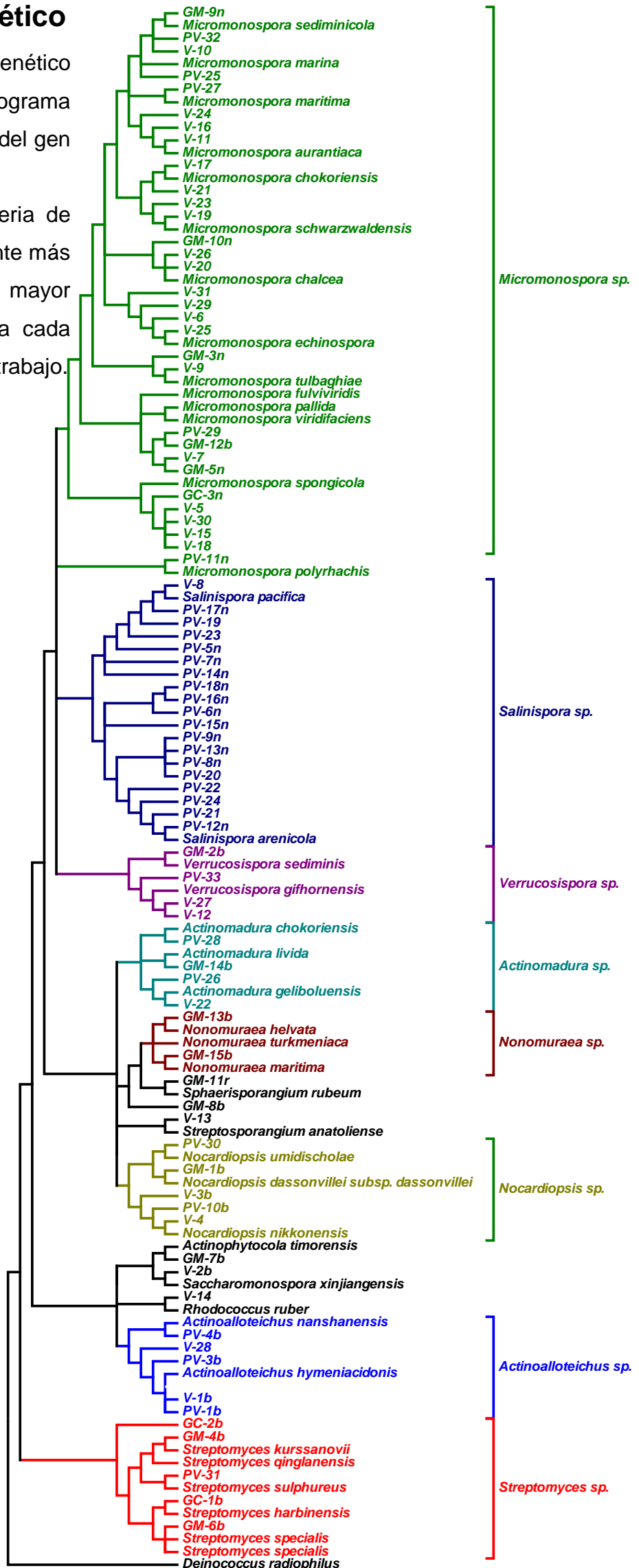
* Sometida a extracción de metabolitos secundarios.

G:Gentamicina, R: Rifampicina

A. 2. Árbol filogenético

Árbol filogenético construido con el programa MEGA6 y las secuencias del gen 16s del ARNr.

Se muestra la bacteria de referencia filogenéticamente más cercana (con el mayor porcentaje de similitud) a cada cepa identificada en este trabajo.



A 3. Base de datos. Muestras de sedimentos, información de la colecta de los sedimentos marinos empleados.

Muestra	Año de colecta	Sitio de colecta	Posición geográfica	Profundidad
E1-4	2008	Loreto, GC.		20 m
E2-1	2008	Loreto, GC.		20 m
E2-4	2008	Loreto, GC.		20 m
E10-1	2008	Loreto, GC.		20 m
E10-2	2008	Loreto, GC.		20 m
E14-1	2008	Loreto, GC.		20 m
E4-2	2011	Loreto, GC.		200 m
E20-2	2011	Loreto, GC.		302 m

ANEXO 2

RECOMENDACIONES GENERALES

Notas acerca del estudio con actinobacterias marinas.

Anexo 2 Recomendaciones Generales

- a) Manejo de las muestras de sedimento: con el fin de evitar contaminación por actinobacterias de otros ambientes, se debe conservar especial cuidado en el manejo de las muestras de sedimentos marinos y/o de los otros tipos de muestras naturales. Estas deben conservarse en bolsas o recipientes estériles, si están húmedas, deberán permanecer congeladas a -20 °C hasta su posterior pretratamiento, si están completamente secas, deberán conservarse en un área sin humedad (ej. Desecador). Durante su manipulación, se deberán emplear equipos y materiales estériles para evitar su contaminación.

- b) Identificación preliminar de actinobacterias: los rasgos morfológicos de actinobacterias han sido ampliamente descritos en diversas publicaciones internacionales y nacionales, en este trabajo se han citado muchas de ellas, por lo que pueden ser utilizados como guías confiables para la identificación preliminar de cepas de actinobacterias. Así también, las características morfológicas descritas en el capítulo 6, a pesar de ser específicas de las cepas analizadas en este estudio, sirven de guía para la identificación preliminar a nivel de género de actinobacterias raras.

- c) Preparación del medio de cultivo A1-75%: para preparar, por ejemplo, 1 litro de medio líquido, se recomienda mezclar inicialmente los 750 mL agua de mar con los 250 mL agua destilada, poner a calentar alrededor de 900 mL de esta mezcla, y dejar el resto (~100 mL) para pre disolver los componentes del medio (almidón, peptona y levadura). Primero, se recomienda pesar por separado los 10 gr de almidón de la peptona y levadura, el almidón se pre disuelve con una parte de los 100 mL conservados para esto, posteriormente se agrega el almidón pre disuelto a la mezcla una vez que esta ya esté caliente, esto ayudará a disolver el almidón con mayor facilidad. Cuando se observe claridad en el medio (es decir, cuando el almidón esté completamente disuelto) se pueden agregar la peptona y la levadura pre disueltas. Continuar mezclando y calentando, retirar el medio cuando comience a hervir.

- d) Cubiertas para los matraces de cultivo (capuchón): para la elaboración de los capuchones utilizados para cubrir los matraces de medio líquido (de diversos volúmenes) se recomienda utilizar fragmentos cuadrados de tela de algodón (tela tipo pañal) y de papel azul bioescudo resistente a esterilización (Convertor Bio-shield Sterilization Wraps, Cardinal Health, EU.). Se ha comprobado que con 2 fragmentos de tela de algodón por un 1 de papel bioescudo es suficiente para evitar la contaminación de los medios. Los 2 fragmentos de algodón se colocan en contacto con la boca del matraz y el papel bioescudo sobre ellos, se sujetan con ligas elásticas (sin estirar demasiado), se recomienda colocar las ligas lo más abajo posible en el cuello del matraz sujetando el capuchón, esto ayudará a que el capuchón no se descoloque y funcione adecuadamente como un tapón y evite posibles contaminaciones una vez se haya esterilizado el o los matraces. Una vez estériles, se recomienda colocar todo el material inmediatamente en la campana de flujo laminar para que se seque, una vez seco, si no se utiliza inmediatamente, se pueden conservar en una caja de plástico limpia, esteril y con tapa, para esto se recomienda cubrir cada capuchón con trozos de papel aluminio. Los capuchones puede reutilizarse varias veces, sin embargo, durante su uso van adquiriendo suciedad del propio medio, se recomienda remojarlos en agua con hipoclorito al 10%, enjuagarlos con agua corriente y secarlos en estufa. Para evitar contaminación se recomienda desechar aquellos que presenten rasgaduras o roturas.
- e) Antibióticos en el medio de cultivo: si se requiere agregar antibióticos a los medios de cultivo, estos se deben agregar a los medios una vez esterilizados. En el caso del medio sólido, los antibióticos se agregan minutos después de haberlos sacado de la esterilizadora, cuando ya no se encuentre tan caliente y al tacto no queme, justo antes de comience a solidificarse (~ 45 °C).
- f) Crecimiento de las actinobacterias: en este trabajo se observó que algunas cepas de actinobacterias crecen mucho más lento que otras. En diversas ocasiones las cepas que crecían más lento se incubaron a temperaturas

diferentes de 28 °C, para estimular el crecimiento rápido de las mismas. Esto debe de considerarse cuando se pretende extraer los metabolitos secundarios producidos durante la fase estacionaria de su crecimiento. Se recomienda trabajar con dos grupos de actinobacterias, las que crecen más rápido (ej. tipo *Streptomyces*) y las que pueden llegar a crecer más lento (ej. *Salinispora*), a fin de tener un mayor control en la extracción de los metabolitos secundarios.

- g) Extracción de metabolitos secundarios: durante la extracción de los metabolitos secundarios con AcOEt, se recomienda emplear sulfato de sodio para eliminar el agua que haya quedado en la fase orgánica de la extracción. Esta sal puede ser reutilizada, para esto, se le aplican diversos enjuagues con agua y otros solventes orgánicos (como MeOH y Acetona) hasta que vuelva a aclararse. Se decanta el líquido de los enjuagues y se seca en una estufa. Posteriormente se trituran los grumos que se hayan formado para poder utilizarla de nuevo.
- h) Extracción de ADN de cepas tipo-*Streptomyces*: Las cepas tipo-*Streptomyces* se caracterizan por producir gran cantidad de esporas, esto puede acarrear problemas en la extracción del ADN, ya que en base a lo observado en este estudio, una gran cantidad de esporas no garantiza cantidad suficiente de ADN. Para solventar esto, se recomienda congelar el gránulo de células dispuesto para la extracción de ADN en el propio buffer para la lisis celular, y mientras esté congelado, intentar romper lo más que se pueda el gránulo de células congeladas, esto con el fin de propiciar que los cristales de hielo rompan las esporas y se pueda extraer el ADN de las mismas con mayor facilidad.
- i) La preservación criogénica: una vez que se alcanza la purificación de cepas aisladas de sedimentos marinos, se recomienda, antes de continuar con su estudio y caracterización, preparar varios criopreservados, esto es con el fin de evitar problemas de deriva genética y mutación por el subcultivo frecuente de las cepas. Cuando estén por agotarse los criopreservados, se inocula uno de ellos en medio líquido A1-75% y se prepara otro grupo de criopreservados.