

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS

Aislamiento de actinomicetos presentes en sedimentos marinos de Loreto, Baja California Sur y su evaluación como posible fuente de moléculas antimicrobianas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

P R E S E N T A

Honorio Cruz López

Ensenada, BC MÉX.

Enero 2015

TESIS

Aislamiento de actinomicetos presentes en sedimentos marinos de Loreto, Baja California Sur y su evaluación como posible fuente de moléculas antimicrobianas.

Presentada por Honorio Cruz López como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA.

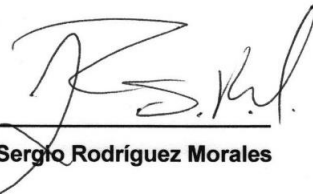
Aprobada por:



**Dra. Irma Esthela Soria
Mercado**
Directora de tesis



**Dra. Nahara Ernestina Ayala
Sánchez**
Sinodal



Dr. Sergio Rodríguez Morales
Sinodal

Ensenada BC, 12 enero 2015

Este trabajo fue realizado en la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California FCM-UABC, bajo la dirección de la Dra. Irma E. Soria Mercado y con el apoyo financiero del proyecto Ciencia-Básica 2011, CONACyT No.168484. Se agradece a CONACyT por las becas de maestría otorgadas 2012-2014 y 2014-2.

© Honorio Cruz López **2015**

Contenido

Abreviaciones	i
Agradecimientos	ii
Resumen	iv
1. Introducción	1
2. Generalidades	4
2.1 Microorganismos patógenos	5
2.2 Actinomicetos marinos	7
2.3 Distribución de actinomicetos marinos	8
2.4 Producción de metabolitos secundarios	9
2.5 Compuestos aislados de actinomicetos	10
2.6 Potencial de México	11
3. Justificación	15
4. Hipótesis	16
5. Objetivos	16
5.1 General	16
5.2 Específicos	16
6. Metodología	17
6.1 Aislamiento de actinomicetos	18
6.2 Identificación molecular	19
6.2.1 Extracción de ADN	20
6.2.2 Amplificación	21
6.2.3 Análisis de las secuencias amplificadas	21
6.3 Cultivo de actinomicetos en medio líquido	22
6.4 Obtención de extractos orgánicos	22
6.4.1 Extracción del medio líquido con acetato de etilo	22
6.4.2 Extracción del pellet bacteriano con acetona y metanol	22
6.5 Ajuste de la microdilución	23
6.6 Ensayo antibacteriano de los extractos	25
7. Resultados	26
7.1 Aislamiento e identificación	26
7.2 Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana	33
7.2.1 Estandarización del bioensayo	33
7.2.2 Evaluación de los extractos	34

8. Discusión	36
8.1 Aislamiento e identificación	36
8.2 Actividad antibacteriana	39
9. Conclusiones	42
10. Bibliografía	43

Abreviaciones

AcOet	Acetato de etilo
ATCC	American Type Culture Collection
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CMI	Concentración mínima inhibitoria
dNTPs	Didesoxinucleótidos
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PN	Producto Natural
pb	Pares de bases
UFC	Unidades formadoras de colonia

Agradecimientos

Dra. Irma E. Soria Mercado

Laboratorio de Química Marina
Facultad de Ciencias Marinas UABC

Dra. Nahara E. Ayala Sánchez

Facultad de Ciencias UABC

MC. Mónica P. Ritchie Espinoza

Laboratorio San Ángel

Dr. Luis M. Enríques Paredes

Laboratorio de Ecología Molecular
Facultad de Ciencias Marinas UABC

Dr. Sergio Rodríguez Morales

Laboratorio de Bioprotección Costera
Facultad de Química UNAM

Este trabajo no podría haber sido posible sin su cooperación

Dedicado a mi familia

Amigos y colegas, por su apoyo incondicional

Resumen

Los actinomicetos han sido una de las principales fuentes de metabolitos secundarios con actividad biológica que se ve reflejada en la gran cantidad de fármacos disponibles para el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas en humanos, animales y plantas. Su capacidad para generar diversas sustancias ha sido revelada gracias a los avances de las técnicas moleculares. Actualmente, las enfermedades infecciosas se han vuelto un problema de importancia público a nivel mundial, debido a que ciertos patógenos están generando mecanismos de resistencia a los antimicrobianos que alguna vez fueron efectivos. Así, existe una necesidad urgente de encontrar nuevas sustancias que puedan ser utilizadas como antibióticos frente a microorganismos multiresistentes. El objetivo de este estudio fue aislar actinomicetos de sedimentos marinos colectados en Loreto Baja California Sur México y evaluar la actividad antibacteriana de los extractos producidos, frente a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Para el aislamiento de actinomicetos se utilizó el método de estampado en seco y la identificación genotípica se realizó por medio de la amplificación del gen 16S ribosomal ARN. Los extractos crudos se obtuvieron a partir de 300 mL de cultivo en medio líquido, para la extracción de los metabolitos se utilizaron disolventes orgánicos y finalmente la prueba antibacteriana se realizó a través del método de microdilución en caldo. Se lograron aislar 46 cepas a partir de 17 muestras de sedimento, cuatro cepas se clasificaron solo hasta orden (*Actinomycetales bacterium*) (9%), cinco no se lograron identificar (11%), las restantes pertenecieron a los géneros *Streptomyces* (39%) *Salinispora* (24%), *Actinomadura* (7%), *Nomomuraea* (6%), *Micromonospora* (4%). Se obtuvieron 138 extractos orgánicos, sólo 105 se utilizaron para la prueba antibacteriana. El bioensayo realizado mostró que el 51.4% de los extractos fue activo sólo frente a bacterias Gram-positivas con valores de CMI 7.8 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. El extracto acetónico de la cepa LBC04_07 fue el más bioactivo presentó una CMI de 7.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *E. faecalis* y *S. aureus*, esta concentración fue la más baja encontrada. La cepa LBC24_01 en el extracto metanólico presentó una CMI 15.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ frente a *S. aureus* y de 31.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ frente a *E. faecalis*. La mayoría de

los extractos mostraron ser más activos frente a *E. faecalis*. A pesar de que no todos los extractos producidos por las diferentes cepas fueron activos, seguirán siendo considerados de interés debido a dos factores: primero, la generación de metabolitos dependen de muchos factores que van desde la cantidad de nutrientes utilizados, el tiempo de incubación, velocidad de agitación entre otros. Segundo, sólo se probaron como agente antibacteriano, existen muchas pruebas a las que pueden ser sometidos por ejemplo: frente a otros agentes patógenos o líneas celulares cancerígenas. El análisis químico del extracto producido por *Streptomyces sp.* LBC04_07 se está llevando a cabo con el fin de identificar el o los compuestos activos.

1. Introducción

Las enfermedades infecciosas son provocadas principalmente por la invasión y crecimiento de microorganismos patógenos (principalmente hongos, virus y bacterias). Siempre han sido preocupantes, puesto que afecta la capacidad funcional del huésped, sumado a una posible propagación que pueda causar epidemia. Con el descubrimiento de los antimicrobianos, los patógenos se han controlado beneficiando enormemente a la humanidad. Sin embargo, en las últimas décadas se ha observado que ciertas bacterias patógenas Gram-positivas y Gram-negativas están desarrollando a una velocidad alarmante múltiples mecanismos de resistencia contra los antimicrobianos que fueron eficaces para combatirlos. Tal es el caso de *Staphylococcus aureus* que es el principal microorganismo involucrado en la infección de piel y tejidos blandos, algunas de estas cepas son capaces de generar la enzima penicilinasas que hidroliza e inactiva la penicilina. La aparición de la meticilina en 1959 fue una solución, sin embargo, unos años más tarde se reportaron aislados resistentes a este y a otros antibióticos volviéndose multiresistentes (Miranda, 2011). Las bacterias Gram-negativas también son eficientes en la adquisición de genes que codifican mecanismos de resistencia, además, están cubiertas con una membrana externa formidable que impide la entrada de moléculas peligrosas, tales como los antibióticos (Peleg y Hooper, 2010; Wright, 2011).

En general ambos tipos de bacterias continúan extendiéndose a lo largo del mundo y adquiriendo resistencia, principalmente en ambientes hospitalarios donde infecta a personas de edad avanzada, inmunocomprometidas e incluso sanas (Crum et al. 2006; Boucher et al. 2009). Esto se convierte en un problema público ya que sin tratamiento la esperanza de vida para un huésped se reduce. Se estima que ~15 millones de muertes anuales en el mundo están relacionadas con las enfermedades infecciosas (Fauci y Morens, 2012).

Mientras que, la incidencia de estos patógenos multiresistentes incrementan (Nathan, 2004), el descubrimiento de compuestos químicos con potencial antimicrobiano disminuye notoriamente. Este hecho, crea la necesidad de explorar nuevos entornos como el océano, el reto es, encontrar nuevos compuestos químicos de amplio espectro efectivos contra las principales enfermedades infecciosas —que actúen sin dañar al huésped—. Las bacterias marinas especialmente las del orden Actinomycetales, se proyectan como una de las fuentes más prometedoras. Es conocido que, estos microorganismos en el ecosistema terrestre han aportado exitosamente una gran variedad de antimicrobianos como: eritromicina, tetraciclina, estreptomicina, vancomicina, empleados en la medicina humana y veterinaria (Berdy, 2005).

Los actinomicetos están ampliamente distribuidos, pueden habitar en la flora, fauna y en los sedimentos donde representan un porcentaje significativo de la microflora (Grossart et al. 2006) así, en cada hábitat existe una posibilidad de encontrar una nueva cepa. Recientemente se ha reportado géneros de actinomicetos autóctonos del medio marino (Maldonado et al. 2005), los resultados son compuestos novedosos con actividad citotóxica, antitumoral y antimicrobiana (Jensen et al. 2005; Lam, 2009). Tal es el caso de Salinosporamide A (Feling et al. 2003) producida por *Salinispora tropica*, con actividad citotóxica y que actualmente se encuentra en ensayos clínicos (Fenical et al. 2009). Otros compuestos recientes son Marinomicina A-D que presentan propiedades antimicrobianas contra bacterias patógenas, fueron aislados de *Marinispora sp.* CNQ-140 (Know et al. 2006, 2009). Además, con el avance en los análisis genómicos, ahora se sabe que un sólo microorganismo es capaz de sintetizar una gran variedad de metabolitos secundarios (Bentley et al. 2002).

En este sentido, el objetivo del presente trabajo de tesis fue analizar 26 muestras de sedimento colectadas en el año 2008 en algunos puntos de las islas Danzante y Carmen de Loreto Baja California Sur en búsqueda de actinomicetos que generen compuestos bioactivos. La primera parte consistió en el aislamiento e identificación molecular de los actinomicetos encontrados a través del gen 16S ARNr. Posteriormente, se obtuvieron extractos (acetónico,

metanólico, acetato de etilo) de cada una de las cepas identificadas. Finalmente, se evaluó el potencial antibiótico de los extractos crudos por el método de susceptibilidad *in vitro* sobre patógenos Gram-positivos *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, y Gram-negativos *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

2. Generalidades

Nuestro planeta cuenta con una gran biodiversidad que está adaptada al hábitat en el que vive, la cual es altamente competitiva. Como consecuencia algunos organismos en su metabolismo generan dos tipos de sustancias, los metabolitos primarios como aminoácidos, proteínas, carbohidratos y lípidos indispensables para el desarrollo, y los metabolitos secundarios que son productos biosintetizados a partir de los metabolitos primarios. Aparentemente los metabolitos secundarios no tienen un papel directo en el crecimiento, desarrollo o reproducción del organismo que las produce. Sin embargo, se cree tiene un papel secundario en la producción de compuestos químicos defensivos para su supervivencia (Montaser y Luesch, 2011).

Los metabolitos secundario (moléculas orgánicas de bajo peso molecular) son también denominados productos naturales (PN) y han sido ampliamente utilizados, principalmente en las poblaciones más aisladas donde los medicamentos comerciales no son muy comunes o simplemente utilizan el conocimiento transferido generación tras generación —medicina tradicional—. Las investigaciones relacionadas con los PN están enfocadas a estudiar los compuestos presentes en la naturaleza y comprende desde la obtención del organismo que los produce, identificación, cultivo, pruebas biológicas, hasta la elucidación estructural y su síntesis química. La industria farmacéutica ha sido las más interesada en descubrir los principios activos de estas fuentes, debido a las grandes ganancias económicas que puede dejar. La quinina utilizada contra la malaria y el taxol utilizado para combatir el cáncer, son uno de los tantos compuestos obtenidos de plantas que se han logrado aislar y aplicar. Pero no sólo las plantas han aportado compuestos con actividad biológica, de los microorganismos se han aislado compuestos interesantes como la penicilina, eritromicina, tetraciclina, estreptomina, vancomicina utilizadas como antimicrobianos (Berdy, 2005).

En términos generales los microorganismos, principalmente hongos y actinomicetos, son los más estudiados debido a su capacidad para producir una gran cantidad de antibióticos que suelen ser poco tóxicos para el huésped (Berdy, 2005). Así, la mayoría de los antibióticos usados actualmente fueron aislados de actinomicetos en los años 40-70s (Fernebros, 2011).

2.1 Microorganismos patógenos

Los microorganismos viven en una gran cantidad de hábitats desde el suelo hasta en los humanos, algunos cumplen funciones ecológicas muy importantes y otros son patógenos que causan enfermedades en otros organismos. Las enfermedades infecciosas en plantas, animales y humanos, están relacionadas con microorganismos que presentan genes de virulencia los cuales tienen la capacidad de afectar al huésped. Por otra parte, un antimicrobiano es un compuesto producido de forma natural, sintética o semi-sintética capaces de inhibir los procesos vitales de otro organismo llevándolo a la muerte. Su función implican destruir o inhibir el crecimiento del patógeno, estos efectos se conocen como bactericida y bacteriostático respectivamente. El efecto del antimicrobiano puede ser de amplio espectro, es decir, cuando es eficaz contra organismos de diversos tipos (p. ej., bacterias Gram-positivas y Gram-negativas) y de espectro estrecho cuando sólo afecta a un tipo de patógeno.

Los antimicrobianos betalactámicos son los más utilizados debido a su baja toxicidad, se caracterizan por presentar en su estructura un anillo betalactámico (p. ej., penicilinas y cefalosporinas). La penicilina es uno de los antimicrobianos más utilizados para el tratamiento de enfermedades infecciosas, descubierta por Alexander Fleming en 1929, al observar la inhibición de una bacteria patógena contaminada con el hongo *Penicillium notatum*. Unos años después, se empezó a utilizar como antibiótico, cambiando sustancialmente el pronóstico de las infecciones bacterianas —los antibióticos, tienen un origen biológico—. Sin embargo, unos años más tarde de su descubrimiento, se reportó en Londres, Reino Unido y Estados Unidos, aislamientos de *S. aureus* productoras de una enzima llamada penicilinasas, esta le confiere la

resistencia al principio activo de la penicilina. La aparición de la meticilina en 1959, fue una solución temporal; la resistencia de las bacterias patógenas había iniciado.

La resistencia puede ser natural o adquirida, un ejemplo de la primera son todos los microorganismos que producen antibióticos, la segunda es preocupante ya que puede surgir por mutaciones cromosómicas o por mecanismos de transferencia genética. Algunas cepas bacterianas cuentan con múltiples mecanismos de resistencia debido a su alta capacidad de adaptación. Algunos de estos mecanismos son; expulsar el antibiótico a través de una bomba como si fueran desechos de excreción, disminuir la permeabilidad de su membrana para bloquear el ingreso del antimicrobiano y la producción de enzimas que hidrolizan a los antibióticos (Dale-Skinner y Bonev, 2009). De esta forma queda claro los múltiples y efectivos mecanismos de resistencia que no son excluyentes ya que pueden estar presente en una misma cepa **Fig. 1**.

Una sola bacteria puede desarrollar varios mecanismos para uno o más antibióticos, las cepas de *E. aureus* resistentes a la penicilina, tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol, gentamicina, meticilina y vancomicina, es un claro ejemplo de la capacidades de esta y en general de las bacterias. La mayoría de los antibióticos son menos efectivos cuando se trata de bacterias Gram-negativas, la membrana externa de estas bacterias impide el paso de los antibióticos a su sitio de acción.

Las infecciones causadas por *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Acinetobacter baumannii* también pueden causar la muerte al huésped (Radecka et al. 2015). Hoy en día, la resistencia de ambos tipos de bacterias es uno de los temas más preocupantes en la salud pública, debido a las limitadas opciones de tratamiento cuando se trata de una resistencia a múltiples fármacos (Fischbach M y Walsh C, 2009).

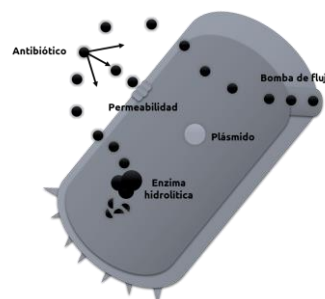


Figura 1. Mecanismos de resistencia antimicrobiana. Modificada de Walsh y Fischbach 2009.

La búsqueda de alternativas para combatir las principales enfermedades incluyendo infecciones bacterianas, ha generado análisis de numerosas fuentes que van desde plantas hasta microorganismos. Por lo tanto, cada año se reportan una gran cantidad de compuestos químicos aislados. No obstante, la tasa de descubrimiento de moléculas efectivas ha disminuido drásticamente o simplemente se están redescubriendo compuestos (Clardy et al. 2006).

2.2 Actinomicetos marinos

Las actinobacterias o mejor conocidas como actinomicetos, actualmente cuenta con 22 órdenes y 273 géneros (Gao y Gupta, 2012). Los miembros se caracterizan por contener genomas con un alto porcentaje de guanina y citosina ~70% (Ventura et al. 2007). Los actinomicetos forman un grupo de microorganismos morfológicamente muy variables, un rasgo característico que se puede ver en la placa de cultivo es que están adheridas al agar, normalmente son secas, algunas forman esporas por lo que la placa se ve cubierta por una capa pulverulenta y que tienen una tasa de crecimiento menor comparada con otras bacterias. Son generalmente bacterias Gram-positivas y están ampliamente distribuidas en ambientes terrestres y acuáticos. La mayoría tiene la capacidad de formar filamentos ramificados denominados micelio, pueden ser vegetativo o aéreo, que están relacionadas con la absorción de nutrientes y con formación de esporas. Tienen la capacidad de reproducirse por fisión, la formación de las esporas se debe a la disminución o agotamiento de los nutrientes, su forma puede ser muy variada y en la mayoría de los casos no son resistente al calor pero si a la desecación, así, pueden permanecer en estado latente por un largo tiempo incluso siglos. Cuando una espora encuentra las condiciones favorables, da lugar a un tubo germinal e inicia su desarrollo, en consecuencia las esporas son dispositivos de supervivencia.

El interés por estos microorganismos comenzó por el descubrimiento de su habilidad para producir metabolitos secundarios bioactivos, los cuales resultan ser potentes. Compuestos como la estreptomycin, rifampicina, tetraciclina, vancomicina y eritromicina han sido obtenidos a partir de actinomicetos terrestres, destacando el género *Streptomyces* (Manivasagan et al.

2013). En el ambiente marino los actinomicetos pueden habitar en moluscos, peces, esponjas, algas, manglares y sedimentos (Rathna Kala y Chandrika, 1993; Villareal-Gómez et al. 2010; Abdelmohsen et al. 2010). Bull et al. (2005), ha reportado que los actinomicetos representan un 9% de la comunidad microbiana en los sedimentos marinos.

Las relaciones simbióticas que tienen en el medio marino demuestran sus estrategias para colonizar diferentes hábitats, se cree que estas relaciones propician la secreción de metabolitos secundarios para proteger al huésped (Manivasagan et al. 2013a). Otra de sus características es su papel ecológico, ya que participa en la descomposición y remineralización de la materia orgánica, incluyendo compuestos complejos como la lignocelulosa y quitina, liberándolos para ser aprovechados por otros organismos, de esta forma contribuye en los ciclos biogeoquímicos (Kutzner H. 1968; Grossart et al. 2006).

2.3 Distribución de actinomicetos marinos

En un inicio se supuso que los primeros actinomicetos aislados tenían un origen terrestre (Cross, 1981), ya que se consideraba que su presencia en el medio marino se debía a las esporas que fueron transportadas hacia el mar. En 1984 se logró identificar la primera especie conocida como *Rhodococcus marinonascens* (Helmke y Weyland, 1984) posteriormente, se fueron descubriendo otros géneros.

Hoy en día, se están realizando estudios de diversidad y distribución de los actinomicetos con base en análisis moleculares. El análisis del ácido ribonucleico ribosómico 16S (ARNr), es una secuencia ampliamente utilizada como marcador molecular para la identificación bacteriana. Fue propuesta por Woese en 1970, debido a que se ha mantenido con pocos cambios evolutivos, está presente en todas las bacterias y es una cadena con un buen tamaño ~1500 pb, lo que facilita el análisis de secuenciación para identificar a nivel de género o especie.

Así, el análisis del 16S ARNr ha facilitado la identificación de diferentes géneros de actinomicetos en el medio marino; *Actinomadura*, *Saccharopolyspora*, *Streptomyces*,

Solwaraspora, *Micromonospora*, *Micrococcus*, *Nocardioides*, *Nonomuraea*, *Verrucosispora*, *Marinophilus*, *Dietzia*, son algunos de ellos. Los géneros *Salinispora* y *Marinispora* se han descrito como exclusivamente marinos debido a que necesitan agua de mar para crecer, este hecho confirma la existencia de actinomicetos marinos (Mincer et al. 2002: 2005; Bruns et al. 2003; Maldonado et al. 2005: 2005b; Kwon et al. 2006; Ward y Bora, 2006; Maldonado et al. 2009). La identificación genómica de las dos especies descritas del género *Salinispora* han demostrado que cuenta con grupos de genes (~17) que le permite sintetizar diversos metabolitos secundarios (Udwary et al. 2007; Penn et al. 2009).

2.4 Producción de metabolitos secundarios

Es importante considerar que actualmente menos de 1% de los microorganismos pueden ser aislados (Kennedy et al. 2010). Los primeros pasos son cultivarlos en condiciones de laboratorio y lograr que produzcan metabolitos secundarios. Esto dependen de diferentes factores; componentes nutricionales del medio de cultivo, pH, temperatura, oxigenación, además varían entre una especie y otra (Bode et al. 2002; Sujatha et al. 2005). Existen diversos métodos para el aislamiento de actinomicetos en sedimentos marinos, algunos incluyen: estampado en seco, diluciones en agua marina estéril y calentamiento de la suspensión, uso de fenol y antibióticos por mencionar algunos. Se ha documentado que la síntesis de metabolitos secundarios está relacionada con el agotamiento de nutrientes (Bode et al. 2002; Bibb, 2005). Sanchez y Demain (2002), describen que la formación de metabolitos secundarios está regulada por nutrientes como nitrógeno, fósforo y carbono, cuando la tasa de crecimiento decrece la tasa de producción de metabolitos es alta, pero esto depende de la cantidad de biomasa bacteriana. No todos los metabolitos secundarios son bioactivos, además, pueden tener actividades específicas, por lo que, es indispensable realizar diversas pruebas biológicas, las principales son: antibacteriano, antifúngico, anticancerígeno, antitumoral, antiinflamatorio, antimalaria, antiviral, antioxidante y citotóxico. Los extractos (compuestos producidos por la bacteria y residuos del medio de cultivo) son sometidos a procesos de fraccionamiento químico biodirigido el cual conducirá al compuesto responsable de la actividad.

2.5 Compuestos aislados de actinomicetos

Como bien se sabe el océano representa el hábitat más extenso y extremo del planeta, encierran una gran biodiversidad de macro y micro organismos. Alguno de estos generaron a lo largo de los años diversas adaptaciones fisiológicas entre ellas defensas químicas para sobrevivir ante este ambiente hostil. En contraste se espera que los metabolitos secundarios producidos por diversos organismos marinos sean diferentes a los terrestres (Williams et al. 1989; Firn y Jones, 2003). Ante este panorama, en la actualidad las investigaciones están enfocados en el estudio de los metabolitos secundarios, generados por diversos organismos, entre ellos los actinomicetos. En la **tabla 1** se pueden observar algunos compuestos que se han aislado de actinomicetos marinos con sus respectivos efectos biológicos (Soria-Mercado et al. 2005; Hughes et al. 2008; Adbel-Mageed et al. 2010; Valli et al. 2012; Dasari et al. 2012).

Las cepas del género *Salinispora* han mostrado 80% actividad antitumoral y 35% actividad antibiótica (Fenical y Jensen 2006; Asolkar et al. 2006; Williams et al. 2007). El compuesto Salinosporamide A (NPI-0052) que fue aislado de *Salinispora tropica*, se encuentra en la fase clínica I para el tratamiento de cáncer, convirtiéndose en el primer candidato a fármaco obtenido de un actinomiceto marino (Feling et al. 2003; Fenical et al. 2009). Otros compuestos novedosos: la marinomicina A, que presenta actividad contra células tumorales (18.8 y 12.6 nM), además es bioactivo contra *Enterococcus fascieum* resistente a vancomicina y *S. aureus* resistente a meticilina en concentraciones de 0.12 y 0.625 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Know et al. 2006). La abisomicina C, fue aislado de la cepa *Verrucosisspora maris* AB-18-032 encontrada a una profundidad de 289 m en el mar de Japón, este nuevo antimicrobiano es efectivo contra cepas de *S. aureus* resistentes a metacilina y vancomicina (Riedlinger et al. 2004). También, presentó un efecto bactericida contra *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium tuberculosis* con valores de CMI 3.6 y 7.2 μM (Freundlich et al. 2010). La mayoría de los autores que han aislado actinomicetos de diferentes fuentes, señalan que *Streptomyces* es el género predominante, sin embargo, los metabolitos de los géneros obligados y actinomicetos raros son muy potentes.

Tabla 1. Algunos metabolitos secundarios producidos por actinomicetos marinos.

Especie	AB	Compuesto
<i>Streptomyces sp.</i>	2	Glaciapyrroles
<i>Streptomyces sp.</i>	2	Tirandamycins
<i>Marinispora</i>	2	Marinomycins
<i>Micromonosproa sp.</i>	2	Diazepinomicin
<i>Actinomadura sp.</i>	3	Chandrananimycin
<i>Salinispora tropica</i>	4	Salinosporamide A
<i>Streptomyces sp.</i>	4	Caprolactones
<i>Salinispora arenicola</i>	5	Arenicolides
<i>Streptomyces sp.</i>	5	Chalcomycin
<i>Streptomyces sp.</i>	5	Elaiomycins B y C
<i>Salinispora arenicola</i>	5	Arenimycin
<i>Salinispora pacifica</i>	1	Pacificanones
<i>Streptomyces chibaensis</i>	1	Resistoflavine
<i>Streptomyces sp.</i>	1	Actinofuranones
<i>Salinipora tropica</i>	1	Salinosporamide B y C
<i>Streptomyces sp.</i>	1	Nonactin
<i>Streptomyces sp.</i>	1	Manumycins
<i>Salinispora pacifica</i>	1	Salinipyrones
<i>Verrucosipora sp.</i>	1	Proximicins
<i>Streptomyces sp.</i>	6	Salinamides A y B
<i>Streptomyces avermitilis</i>	7	Avermectins
<i>Streptomyces sp.</i>	8	Trioxacarcin
<i>Streptomyces nitrosporeus</i>	9	Benzastatin C
<i>Dermacoccus abyssi</i>	1	Dermacozines A-G

AB: actividad biológica. 1: citotóxica, 2: antibacteriana, 3: antifúngica, 4: anticancerígena, 5: antitumoral, 6: antiinflamatorio 7: antiparasitaria, 8: antimalaria, 9: antiviral.

Un estudio preclínico realizado por el Instituto Nacional del Cáncer (INC) de EUA., señaló que aproximadamente el 1% de las muestras marinas obtenidas de diferentes fuentes mostraron un potencial antitumoral frente a 0.1% de las muestras terrestres, esto demuestra el potencial de los recursos marinos (Munro et al. 1999; Montaser y Luesch, 2011). El potencial de los actinomicetos se ve reflejado en más de 10 mil compuestos producidos por actinomicetos terrestres y marinos, donde el 75% está representado por el género *Streptomyces* y el 25% por actinomicetos raros (Berdy, 2005). Así, queda claro que los microorganismos marinos constituyen una importante fuente de productos naturales.

2.6 Potencial de México

Contamos con una gran biodiversidad de recursos marinos, debido a nuestras regiones oceánicas y costeras. Nos rodea el Océano Atlántico que incluye al Golfo de México y Mar Caribe, el Océano Pacífico con el Golfo de California y el Istmo de Tehuantepec (CONABIO, 2013). Ofreciendo una oportunidad única para encontrar nuevas especies de actinomicetos, las cuales puedan sintetizar nuevas estructuras químicas con posible actividad en salud humana, considerando que estos microorganismos están adaptados a este ambiente marino.

Los estudios relacionados con actinomicetos marinos en México están iniciando. Uno de los lugares por excelencia es el Golfo de California (GC) o mejor conocido como Mar de Cortés, algunos de ellos se describen a continuación.

El primer reporte encontrado sobre actinomicetos marinos en GC, fue de Mincer y colaboradores en el 2002, cuando analizaba muestras de sedimentos de las Bahamas, Mar rojo y GC, las cepas que encontró las clasificó como MAR1 entre ellas estaba la CNH964 aislada de sedimentos arenosos del GC y que requerían agua de mar para crecer. Más tarde al analizar las cepas de las Bahamas se propuso un género denominado "*Salinospora*" el cual produce el compuesto Salinosporamide (Feling et al. 2003). Finalmente, Maldonado et al. (2005), realizó una serie de pruebas fenotípicas y genotípicas, y renombró el género a *Salinispora* e identificó dos nuevas especies *S. tropica* y *S. arenicola* convirtiéndose en los primeros actinomicetos marinos obligados, además existen dos filo-tipos de *S. arenicola* "A y B" que sólo se han registrado en el GC. Mincer y colaboradores en ese mismo estudio describe que de las cepas aisladas el 86% de los extractos crudos mostraron bioactividad citotóxica frente a la línea celular HTC-116 con un IC_{50} 0.004-16.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y antibiótica frente a *Candida albicans* resistente a anfotericina y *Eterococcus faecium* resistente a vancomicina con CMI 19.5 y 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente. Posteriormente, se propuso una nueva especie *Salinispora pacifica*, que se ha aislado de diferentes puntos, Mar rojo, Hawaii, Australia, entre otros, incluyendo el Golfo de California, esta cepa difiere sólo por doce nucleótidos con *S. arenicola* tipo A o B y sólo uno con *S. tropica*, actualmente, fue aceptada como una nueva especie (Jensen y Mafnas, 2006; Ahmed et al. 2013).

Maldonado et al. (2009), identificó 12 géneros de actinomicetos encontradas en muestras de sedimento del Gofu de México y GC; *Verrucosipora*, *Micromonospora*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Salinispora*, *Solwaraspora*, *Nonomuraea*, *Actinomadura*, *Dietzia*, *Saccharopolyspora*, *Saccharopolyspora* y *Streptomyces*, en el GC aisló 200 cepas pertenecientes a ocho géneros, este es el primer reporte oficial en México.

Villarreal-Gómez et al. (2010), al estudiar algas marinas recolectadas en Bahía Todos Santos, aisló actinobacterias asociadas a *Codium fragile*, *Endarachne binghamiae*, *Sargassum muticum* y *Laurencia pacifica*, para evaluar la actividad anticancerígena y antibacteriana de

extractos. Los extractos crudos de las cepas de actinobacterias fueron probadas contra *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis*, los resultados mostraron moderada bioactividad frente a *Proteus mirabilis* y la línea celular HCT-116. Torres et al. (2012), evaluó un total de 69 extractos orgánicos de las cepas identificadas como *Micromonospora*, *Salinispora* y *Verrucosipora*, encontradas en muestras de sedimentos de bahía Concepción y bahía de los Ángeles, de los cuales 17 mostraron actividad contra las líneas celulares de cáncer de mama (MCF7) y cérvix (HeLa), tres extractos acuosos mostraron actividad antibiótica contra *S. aureus*, que es resistente a la metilina.

Becerril-Espinosa et al. (2013), analizó 126 muestras de sedimento colectadas en el Golfo de California de las cuales aisló 1497 colonias que presentaban características morfológicas de los actinomicetos, además, describe que la mayoría de las colonias no crecieron en medio preparado con agua destilada. De acuerdo con el análisis filogenético de 136 cepas identificó ocho géneros: *Actinomadura*, *Salinispora*, *Micromonospora*, *Nocardiopsis*, *Nonomuraea*, *Saccharomonospora*, *Streptomyces* y *Verrucosipora*. Esta misma autora señala en su tesis de doctorado que 302 extractos orgánicos se les probó su actividad antibiótica contra *P. aeruginosa* y *Proteus vulgaris* encontró que el 65.2% de los extractos presentó actividad contra uno o ambos patógenos (Becerril-Espinosa, 2011). Además analizó siete muestras de sedimento de la Bahía de Todos Santos encontrando 26 colonias, de las cuales pertenecen a los géneros *Streptomyces* (77%), *Micromonospora* (20%) y *Nocardia* (3%). El 19% de los extractos crudos del género *Streptomyces* mostraron actividad citotóxica en un rango de IC_{50} de 0.076 a 69.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra células de cáncer de colon HCT-116 (Becerril-Espinosa et al. 2012).

Castro-Ochoa, (2014), en su tesis analizó diversas muestras de sedimentos de diferentes lugares de México incluyendo el GC, reportó diferentes géneros *Actinoalloteichus*, *Actinomadura*, *Streptomyces*, *Actinophytocola*, *Astrosporangium*, *Nomomuraea*, *Nocardiopsis*, *Micromonospora*, *Saccharomonospora*, *Rhodococcus*, *Streptosporangium*, *Verrucosipora* y *Salinispora*. Algunos de los extractos obtenidos presentaron bioactividad, una concentración

inhibitoria máxima media $CI_{50} < 0.076 \mu\text{g mL}^{-1}$ frente a la línea celular HTC-116 y una CMI $< 1.95 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra *S. aureus* resistente a meticilina. Guillen-Matus, (2014), en su tesis analizó dos filotipos A y B de *S. arenicola* aislada del GC, a través de la técnica redes moleculares (Molecular networking), confirmando los compuestos observados para este género como rifampicina S-W, rrenimicina A, salinketal A y estarurosporina. Esta técnica es interesante debido a que puede cambiar la forma tradicional de búsqueda de metabolitos secundarios producidos por actinomicetos u otros microorganismos.

3. Justificación

Actualmente, las enfermedades infecciosas se han vuelto un problema de importancia a nivel mundial dado que, ciertos patógenos están generando mecanismos de resistencia a los antimicrobianos que alguna vez fueron efectivos. Así, existe una necesidad urgente de encontrar nuevas sustancias que puedan ser utilizadas como antibióticos frente a microorganismos multiresistentes como lo es *Staphylococcus aureus* (SARM-SARV) y bacterias Gram-negativas. La búsqueda de fármacos antibióticos ha llevado a los investigadores a explorar diferentes hábitats, incluyendo el ambiente marino. Los resultados de las investigaciones en el ambiente marino han sido positivos, ahora se conocen diferentes géneros de actinomicetos facultativos y obligados. Los compuestos que se han obtenido, presentan diversas propiedades biológicas y estructuras químicas únicas.

Los actinomicetos han sido una de las principales fuentes de metabolitos secundarios con actividad biológica que se ven reflejados en una gran cantidad de fármacos que se utilizan hoy en día para el tratamiento de diversas enfermedades en humanos, animales y plantas. Su capacidad para generar diversas sustancias ha sido revelada gracias a los avances en las técnicas moleculares.

En este sentido, el medio marino es una fuente potencial de medicamentos que pueden ayudar a combatir las diversas enfermedades crónicas o infecciosas. En México existen pocos trabajos relacionados con estos microorganismos. Por lo tanto, en este trabajo se analizan 26 muestras de sedimento marino en búsqueda de actinomicetos que produzcan compuestos con potencial de acción frente a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Esta valoración preliminar servirá para avanzar en la búsqueda de compuestos con potencial farmacológico.

4. Hipótesis

Los actinomicetos cultivables presentes en los sedimentos marinos de Loreto, Baja California Sur, son capaces de generar sustancias con propiedad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

5. Objetivos

General

Analizar muestras de sedimento marino obtenidas en algunos puntos de las islas Danzante y Carmen ubicadas en Loreto BCS, en búsqueda de actinomicetos y determinar el potencial antibacteriano.

Específicos

- 1) Aislar actinomicetos cultivables a partir de muestras de sedimento marino.
- 2) Identificar los actinomicetos aislados por medio de la amplificación del gen 16S ARN ribosomal.
- 3) Cultivar las bacterias aisladas e identificadas a nivel de 300 mL.
- 4) Generar los extractos de los actinomicetos aislados a través de cultivo líquido.
- 5) Implementar y validar el método de microdilución en caldo para la evaluación antibacteriana.
- 6) Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos generados frente a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

6. Metodología

El siguiente trabajo se desarrolló en las instalaciones de la FCM -UABC, particularmente en los Laboratorios de Microbiología, Química marina y Ecología molecular. El trabajo se dividió en cuatro etapas **Fig. 2**. Las 26 muestras de sedimento utilizadas fueron obtenidas por el grupo de trabajo de la Dra. Irma Esthela Soria Mercado en un crucero oceanográfico que se llevó a cabo en el año 2008 en algunos puntos de las islas Danzante y Carmen ubicadas en el Loreto, BCS **Fig. 3**. Los sedimentos fueron colectados a diferentes profundidades (49 a 309 m) con ayuda de una draga de acero inoxidable de 12 cm de longitud. Las muestras se colocaron en bolsas de polietileno estériles y se mantuvieron en frío hasta ser transportadas al laboratorio. Una vez en el laboratorio, fueron secadas y almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento.

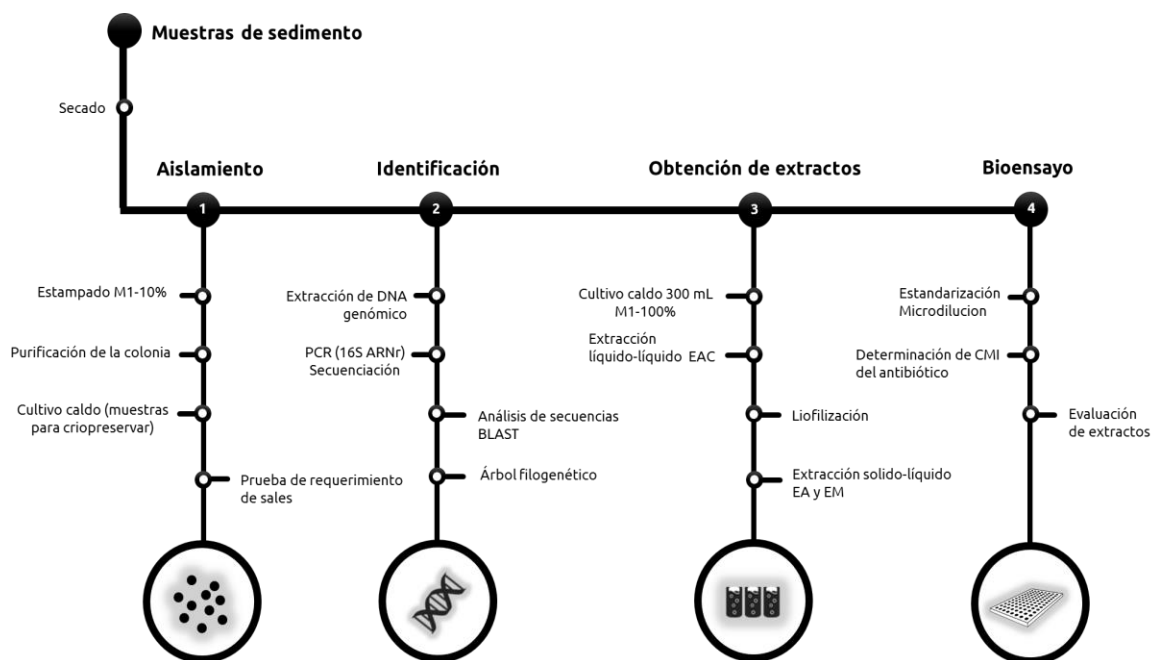


Figura 2. Etapas de trabajo para la búsqueda de compuestos antimicrobianos producidos por actinomicetos. A1: medio de cultivo, PCR: reacción en cadena de la polimerasa, BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, CMI: concentración mínima inhibitoria, EAC: extracto de acetato de etilo, EA: extracto de acetona y EM: extracto de metanol.

6.1 Aislamiento de actinomicetos

Aproximadamente tres gramos de sedimentos previamente pulverizados fueron transferidos a cajas de Petri estériles. Posteriormente, se inocularon en placa por duplicado con la técnica de estampado seco, que consiste en distribuir la muestra de sedimento en forma circular hasta cubrir toda la caja (Mincer et al. 2002). Se utilizó el medio de cultivo M1-10% que ha sido reportado para el óptimo crecimiento de actinomicetos marinos. Fue preparado con 100% de agua marina (almidón 10 g L⁻¹, peptona 0.2 g L⁻¹, levadura 0.4 g L⁻¹ y agar 18 g L⁻¹) suplementados con ciclohexamida 100 µg mL⁻¹ y rifampicina 5 µg mL⁻¹ (Mincer et al. 2005; Gontang et al. 2007). Las placas inoculadas se incubaron a 28 °C hasta el crecimiento de microorganismos, y se revisaron periódicamente con ayuda de un microscopio estereoscópico.

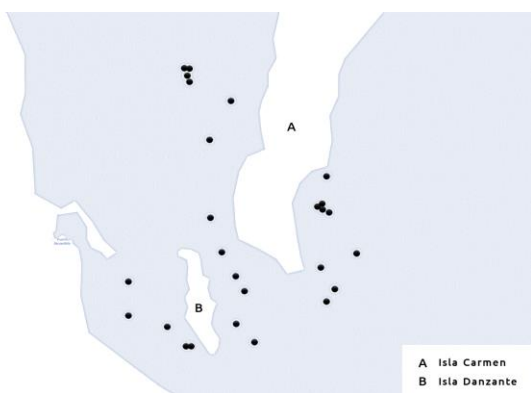


Figura 3. Puntos de colecta de los 26 sedimentos analizados. Loreto Baja California Sur Méx.

Las colonias que presentaron características como, secas, pulverulentas, micelio vegetativo y adheridas al medio se transfirieron a una nueva placa de cultivo preparada con M1-100% (almidón 10 g L⁻¹, peptona 2 g L⁻¹, levadura 4 g L⁻¹ y agar 18 g L⁻¹) sin antibióticos para su posterior purificación e identificación **Fig. 4**. Además, a todas las cepas aisladas se les realizó la

prueba de requerimiento obligado de agua marina, para esto se preparó medio M1-100% en donde se sustituye el agua marina por agua destilada. Se dejó por seis semanas en las mismas condiciones descritas anteriormente.

Los aislamientos fueron codificados con las letras y números; el primer carácter fue la letra inicial del sitio de estudio Loreto (L), la segunda estuvo relacionada con la zona de estudio Baja California (BC), el tercero fue la coordenada de la estación de colecta y el cuarto número asignado correspondió al orden de aparición de cepas en los medios de cultivo (1, 2, 3 etc.).

Una vez purificadas las bacterias se inocularon en 30 mL de medio M1-100% (sin antibióticos) y se mantuvieron a 28 °C con agitación continua a 200 rpm por diez días. Posteriormente, se tomaron muestras para su criopreservación en glicerol al 25%. Además, se transfirió a un tubo Eppendorff 1 mL de las muestras que producían turbidez en el medio y para las muestras que forman aglomerados se tomó de 80-150 mg para su identificación genética **Fig. 5**.

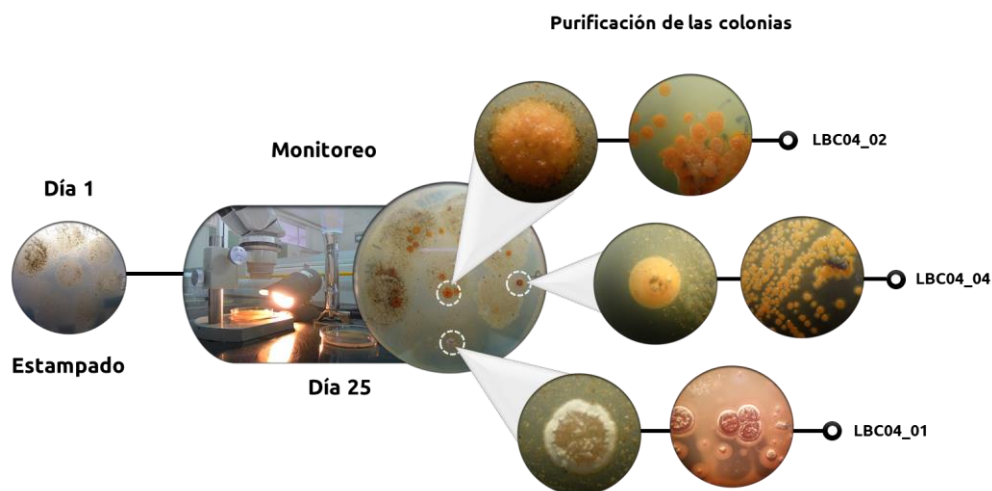


Figura 4. Método de aislamiento de actinomicetos a partir de una muestra de sedimento marino.

6.2 Identificación molecular

La identificación de actinomicetos por medio de rasgos fenotípicos requiere de experiencia y es lenta, además el resultado puede ser ambiguo. Otro factor importante es que las técnicas usadas son para microorganismos ya conocidos, lo que provoca un sesgo en la identificación. Las técnicas moleculares ofrecen una alternativa rápida y precisa para la identificación de los actinomicetos, se basan en la amplificación de un fragmento de ADN por medio de PCR. Las ventajas de estas técnicas son el tiempo, reproducibilidad y que no dependen de criterios subjetivos.

Los ribosomas son utilizados para la síntesis de proteínas, tienen un coeficiente de sedimentación de 70S (unidades Svedberg) con dos subunidades que están constituidas por proteínas y ARNr (r: ribosómico). Se conocen tres tipos de genes 5S y 23S que pertenecen a la subunidades grandes (50S), mientras que la subunidad pequeñas (30S) contiene el gen 16S. El análisis de la secuencia 16S ARNr (también denominado ADN ribosómico ADNr 16S) es la más utilizada para la identificación bacteriana debido a que forma parte de todos los organismos vivos, está altamente conservado pero con la variabilidad suficiente para hacer distinciones entre géneros y especies (Rodicio y Mendoza, 2004).

6.2.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se empleó el método de sales-Proteínasa K propuesto por Aljanabi y Martínez (1997). Las muestras fueron centrifugadas a 8 000 rpm por 2 min y el sobrenadante fue descartado. El pellet fue homogenizado con 400 μ L de una solución estéril del amortiguador TNE (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; NaCl, 400 mM; EDTA 1 mM) y 40 μ L de SDS (20%), se adicionaron 8 μ L de Proteínasa K (20 mg mL⁻¹) y se incubaron a 55 °C por 3 h. Posteriormente, se resuspendido con 300 μ L de NaCl 6M y se centrifugó a 12 000 rpm por 30 min. El sobrenadante se mezcló en un tubo nuevo con 650 μ L de isopropanol al 99%, se congeló a -70 °C por 10 min y se centrifugó por 15 min a 12 000 rpm. Se adicionó 500 μ L de etanol al 70% y se centrifugó por 5 min a 12 000 rpm. Después de la centrifugación el etanol fue descartado y finalmente las muestras fueron centrifugadas con vacío a 55-60 °C por 15 min, el pellet de ADN fue resuspendido en 30 μ L de TE pH 8.0 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM). Las extracciones de DNA fueron verificadas por medio de una electroforesis en agarosa al 1.5% por 50 min a 80 Voltios **Fig. 5**.

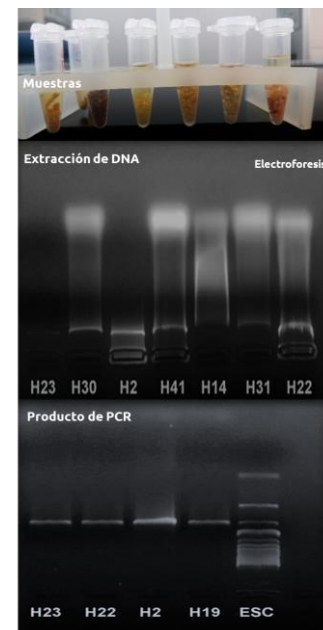


Figura 5. Extracción y amplificación del ADN de las bacterias aisladas.

6.2.2 Amplificación

El gen 16S ARNr se amplificó a partir del ADN obtenido de las bacterias mediante PCR, se utilizaron los cebadores FC27 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y RC1492 (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'). El volumen de la reacción fue en 25 μ L el cual contiene de 30-80 ng de ADN, 10 mM de cada cebador, 1.5 μ M de $MgCl_2$, 0.2 mM de dNTPs, 1 U del enzima Taq polimerasa. En cada reacción se incluyó un control negativo en el que el ADN se sustituye por agua estéril. La amplificación se realizó en un termociclador (Eppendorff Personal), con las siguientes condiciones; una desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 min, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, para la iniciación de los cebadores 60 °C por 1 min y una elongación a 72 °C durante 1 min. Finalmente, una extensión 72 °C por 7 min. El producto de PCR fue verificado con una electroforesis en agarosa 1.5%, se colocó una escalera comercial para confirmar el tamaño esperado del producto. La purificación de los productos de PCR y secuenciación fueron realizadas en la compañía SeqXcel, INC. (<http://www.seqxcel.com/>).

6.2.3 Análisis de las secuencias amplificadas

Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron ensambladas manualmente para obtener un total de 1250 a 1300 nucleótidos con ayuda del programa ChromasPro V1.7.6. (Technelysium). Antes de ensamblar la secuencia completa, los segmentos iniciales y finales de cada secuencia parcial fueron revisados y descartados en caso de presentar errores. Para conocer la probable identidad de cada una de las cepas secuenciadas se utilizó las secuencias disponibles en la base de datos BLAST disponible en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y la secuencia más parecida fue seleccionada para el análisis filogenético. Se utilizó el programa MEGA6 para construir el árbol filogenético mediante el método Neighbour-Joining modelo de Tamura 3-replicas con 1000 réplicas (Saitou y Nei, 1987; Tamura, 1992; Tamura et al. 2013).

6.3 Cultivo de actinomicetos en medio líquido

Las bacterias inicialmente fueron inoculadas en matraces de 125 mL con 30 mL de medio M1-100% e incubados a 28 °C con agitación continua (200 rpm) de 4 a 5 días. Posteriormente, fueron transferidas a matraces con 100 mL de medio M1-100% y se incubaron en las mismas condiciones por 10 días. Tras el período de incubación los cultivos fueron inoculados en placas para verificar alguna posible contaminación.

6.4 Obtención de los extractos orgánicos

Para la adsorción de los compuestos presentes en el cultivo líquido se adiciono Amberlite XAD-7HP 20g L⁻¹ (adsorbente polimérico utilizado para la recuperación de compuestos de bajo peso molecular) y se mantuvo en agitación continua (200 rpm) por 3 h. Los 100 mL del medio fueron centrifugados a 3000 g por 5 min para recuperación de la biomasa microbiana y la resina (pellet). El sobrenadante fue recuperado para obtener una fracción de acetato de etilo y el pellet fue lavado con agua destilada y congelado a -70 para su posterior liofilización.

6.4.1 Extracción del medio líquido con acetato de etilo

Se realizó una extracción líquido-líquido al sobrenadante recuperado de los cultivos para obtener el extracto de acetato de etilo (EAC), para esto se adiciona un volumen de acetato de etilo (100 mL) dejándolo en agitación por 1 h. Posteriormente, se colocó en embudos de separación para obtener la fase orgánica la cual se secó con sulfato de sodio anhidro, finalmente el filtrado se llevó a sequedad mediante rotaevaporador a presión reducida.

6.4.2 Extracción del pellet bacteriano con acetona y metanol

Los compuestos presentes en los pellets fueron extraídos con acetona para los compuestos de menor polaridad y metanol para los de mayor polaridad. Para esto, se colocó el pellet en un matraz y se adicionó 50 mL de acetona, se dejó en agitación por 2 h a 200 rpm,

posteriormente se filtró y se recuperó el extracto acetónico (EA). Para la obtención del extracto metanólico (EM) se realizó el mismo procedimiento sustituyendo la acetona por metanol. Finalmente se llevó a sequedad con rotaevaporador a presión reducida.

6.5 Ajuste de la microdilución

Los microorganismos utilizados incluyen dos cepas Gram-positivas; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (SA), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (EF), y dos cepas Gram-negativas *Escherichia coli* ATCC 11775 (EC), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (PA) donadas por el Laboratorio de Bioprotección Costera, de la unidad de Química en Sisal. Las cepas ATCC, presentan patrones de sensibilidad conocidos, por lo que al montar una prueba de sensibilidad, ésta debe encontrarse dentro de los límites máximos o mínimos descritos por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014).

Se utilizó como antimicrobiano de referencia carbenicilina (Sigma-Aldrich). Se preparó una solución a 10 mg mL^{-1} . El ensayo se realizó mediante el método de microdilución en caldo siguiendo las recomendaciones de Coyle, (2005). Esta prueba evalúa la capacidad de compuesto para inhibir *in vitro* el desarrollo bacteriano.

En una microplaca de 96 pozos se pueden analizar cuatro muestras por duplicado con 11 diluciones o cinco muestras por ocho diluciones. Para ajustar la técnica se utilizó la primera opción. Se debe tener en cuenta que, cada solución debe ser preparada dos veces más concentrada que la deseada (2X) **Tabla 2**. Todo el material empleado fue manejado en condiciones de asepsia. Para poder conocer la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la carbenicilina para cada una de las cepas utilizadas, se dispensaron $100 \mu\text{L}$ de Mueller Hinton Broth (MHB) suplementado con cationes de Ca^{2+} y Mg^{2+} en toda la microplaca, adicionalmente se agregaron $92 \mu\text{L}$ en la primera columna. Se agregaron $8 \mu\text{L}$ solución de carbenicilina en misma columna (concentración inicial en la primera columna es $400 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Posteriormente, se realizaron diluciones dobles, para esto se transfirieron 100 μL de la primera columna a la segunda columna, se volvió a tomar 100 μL de la segunda columna y transfirieron a la tercera, este paso se repite de manera sucesiva hasta la columna once, en esta última los 100 μL fueron descartados. Por último, se adicionaron 100 μL del inóculo bacteriano ajustado a 1×10^6 UFC mL^{-1} en toda la placa (contracción final en la primera columna $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ y la concentración aproximada del inóculo es de 5×10^5 UFC mL^{-1}), excepto al control negativo. En la columna 12 se colocó el control positivo que tiene MHB más el inóculo bacteriano y el control negativo que sólo tiene MHB. El volumen final en cada uno de los pozos de la microplaca fue de 200 μL .

Tabla 2. Concentraciones de la carbenicilina (2X).

Diluciones	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	
Inicial $\mu\text{g mL}^{-1}$	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.563	0.781
Final $\mu\text{g mL}^{-1}$	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.563	0.781	0.391

El inóculo bacteriano fue ajustado por comparación visual con el estándar de turbidez 0.5 en la escala McFarland a partir de los cultivos puros de menos de 20 h en MHB para cada tipo de cepa —la escala 0.5 McFarland representa aproximadamente 1×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC mL^{-1}), y es ampliamente utilizado para las pruebas de susceptibilidad antimicrobianas—. El inóculo final se ajustó a 1×10^6 UFC mL^{-1} con MHB para obtener una concentración aproximada de 5×10^5 UFC mL^{-1} en cada pozo de la microplaca. Además, se midió la absorbancia de los inóculos ajustados a 620 nm, cuyos rangos estaban entre 0.090 y 0.100. Como control de pureza se tomaron 30 μL del inóculo bacteriano ajustado y se colocaron en una placa de Agar Tripticasa Soya (ATS).

Para conocer la concentración del inóculo empleado se realizaron diluciones seriadas, a partir del inóculo ajustado a 1×10^6 UFC mL^{-1} hasta 1×10^1 UFC mL^{-1} , para esto se tomaron 100 μL del inóculo y se adicionaron 900 μL de MHB, se homogenizó y se transfirieron 100 μL a un tubo con 900 μL de MHB, así hasta completar las diluciones: 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10 000 y 1/100

000. Por último, se tomaron 30 μL y se inoculó en una placa con ATS, teóricamente se espera tener de 10-15 UFC. Una vez lista la microplaca y las placas de ATS se incubaron a 35°C por 20 h. Después del período de incubación se revisó el control de pureza. Se contaron las UCF de las placas y se multiplicó por el factor de dilución para obtener la concentración del inóculo empleada. Posteriormente, se revisó la microplaca. Se consideró como CIM la menor concentración del antimicrobiano que inhibe un crecimiento visible del microorganismo.

6.6 Ensayo antibacteriano de los extractos

Una vez estandarizada la técnica, se determinó la concentración mínima inhibitoria de los extractos obtenidos de los actinomicetos aislados, a través del método de microdilución descrito anteriormente, sólo que en este caso se utilizaron ocho concentraciones **Tabla 3**. Primero se prepararon soluciones de cada uno de los extractos obtenidos, a una concentración de 50 mg mL^{-1} . Para esto se pesaron 10 mg de cada extracto y se disolvieron en 200 μL de DMSO al 100% para los extractos de AcOet y Ac, para el caso de EM se disolvieron en DMSO acuoso (50% DMSO; Extracto MeOH). Posteriormente se utilizaron 8 μL para la prueba, de esta forma se aseguró que en la segunda concentración utilizada el porcentaje de DMSO fuera \leq 1%.

Tabla 3. Concentraciones de los extractos utilizados.

Diluciones	Inicial $\mu\text{g mL}^{-1}$	Final $\mu\text{g mL}^{-1}$	% de DMSO final
1	2000	1000	2
2	1000	500	1
3	500	250	0.5
4	250	125	0.25
5	125	62.5	0.125
6	62.5	31.2	0.062
7	31.2	15.6	0.031
8	15.6	7.81	0.015

7. Resultados

7.1 Aislamiento e identificación

De las 26 estaciones analizadas sólo en 17 de ellas se observó crecimiento del orden actinomicetales. Se aisló un total de 46 cepas bacterianas, 21 cepas en la isla Danzante y 25 cepas en la isla Carmen **Fig. 6**. De las colonias morfológicamente parecidas en la placa de cultivo sólo se aislaron dos representantes. En la mayoría de los casos las colonias aisladas crecieron en 15 días, sin embargo, otras tardaron hasta cinco semanas en aparecer en la placa de cultivo. El mayor número de cepas aisladas se obtuvo de la estación E12 seguida de la estaciones E4, E10 y E19 **Tabla 4**. El método de estampado en seco y el medio usado resultó ser muy selectivo, ya que prácticamente no se observó crecimiento de bacterias de crecimiento rápido, ni hongos.

Las características morfológicas macroscópicas que presentaron algunas colonias en la placa de cultivo se pueden observar en la **Fig. 7**. De forma general se observaron colonias elevadas, rugosas, bordes irregulares, con consistencia dura y diferentes colores como, café claro, semitransparentes, rojo, rosa claro, naranja, crema y amarillo. El color de las posibles esporas varió entre: blanco, gris, negro, rosa y café. En algunas colonias estuvo ausente el micelio aéreo, sólo se observó micelio vegetativo. En 30 colonias se observó micelio aéreo este pudo estar semi-desarrollado o desarrollado, en algunos casos el color cambio con el tiempo. En las 16 colonias restantes el micelio estaba ausente. Algunas colonias pigmentaron la placa de cultivo y en otras se observaron halos alrededor de la colonia. En el medio de cultivo líquido la mayoría de las cepas pigmentaron el medio.



Figura 6. Estaciones de los sedimentos analizadas. El círculo punteado indica los puntos de donde se aislaron más actinomicetos.

En algunas colonias estuvo ausente el micelio aéreo, sólo se observó micelio vegetativo. En 30 colonias se observó micelio aéreo este pudo estar semi-desarrollado o desarrollado, en algunos casos el color cambio con el tiempo. En las 16 colonias restantes el micelio estaba ausente. Algunas colonias pigmentaron la placa de cultivo y en otras se observaron halos alrededor de la colonia. En el medio de cultivo líquido la mayoría de las cepas pigmentaron el medio.

Tabla 4. Número de cepas aisladas de sedimentos marinos de Loreto Baja California Sur.

Sitios de colecta	Coordenada	Profundidad (m)	No. de cepas aisladas	Código de aislamiento
Isla Danzante				
Estación 9	25.7655, -111.2191	238	1	LBC09_01
Estación 10	25.7638, -111.2502	63	5	LBC10_02, LBC10.03_LBC10_04, LBC10_01, LBC10_05
Estación 12	25.7933, -111.2802	56	9	LBC12_02, LBC12_03, LBC12_04, LBC12.1, LBC12_05, LBC12_06, LBC12_07, LBC12_08, LBC12_09
Estación 18	25.7959, -111.2283	307	1	LBC18_01
Estación 19	25.8070, -111.2349	306	5	LBC19_02, LBC19_03, LBC19_04, LBC19_05, LBC19_01
Total			21	
Isla Carmen				
Estación 3	25.8063, -111.1695	215	1	LBC03_01
Estación 4	25.8281, -111.1869	286	6	LBC04_01, LBC04_2,LBC04_04, LBC04_05, LBC04_06, LBC04_07
Estación 5	25.8277, -111.1881	200	3	LBC05_02, LBC05_03, LBC05_01
Estación 6	25.8418, -111.1840	226	1	LBC06_01
Estación 8	25.7899, -111.1800	118	1	LBC08_01
Estación 11	25.7842, -111.1842	47	1	LBC09_01
Estación 20	25.8229, -111.2405	302	1	LBC20_02
Estación 21	25.8587, -111.2409	270	3	LBC21.02, LBC21.01, LBC21.03
Estación 22	25.8766, -111.2305	276	2	LBC22_02, LBC22_01
Estación 23	25.8853, -111.2508	303	2	LBC23_01, LBC23_02
Estación 24	25.8883, -111.2519	309	2	LBC24_02, LBC24_01
Estación 26	25.8914, -111.2509	94	2	LBC26_02, LBC26_01
Total			25	

Tres cepas (LBC19_01, LBC24_10 y LBC04_01) presentaron problemas al cultivarlas, su crecimiento fue relativamente lento, pocas colonias se observaron en 40 días de cultivo en placa. En el medio líquido tardaron un mes en crecer, para generar los extractos se decidió dejarlas 25 días y aun así la biomasa bacteriana era mínima. La cepa LBC19_01, no se logró cultivar en medio líquido, después de 20 días la biomasa bacteriana era prácticamente escasa, pero suficiente para extraer ADN, estas tres cepas fueron posteriormente identificadas y pertenecieron al género *Nonomuraea*.

Con respecto a la prueba de requerimiento de sales, sólo el 24.3% de los aislamientos se comportaron como marinas obligadas, dado que después de cinco semanas no se observó crecimiento y fueron consideradas del género *Salinispora* (**Fig. 8a**). No obstante, se observó en algunas cepas facultativas un bajo crecimiento, un desarrollo un tanto diferente y un tiempo más prolongado de crecimiento (**Fig. 8b**).

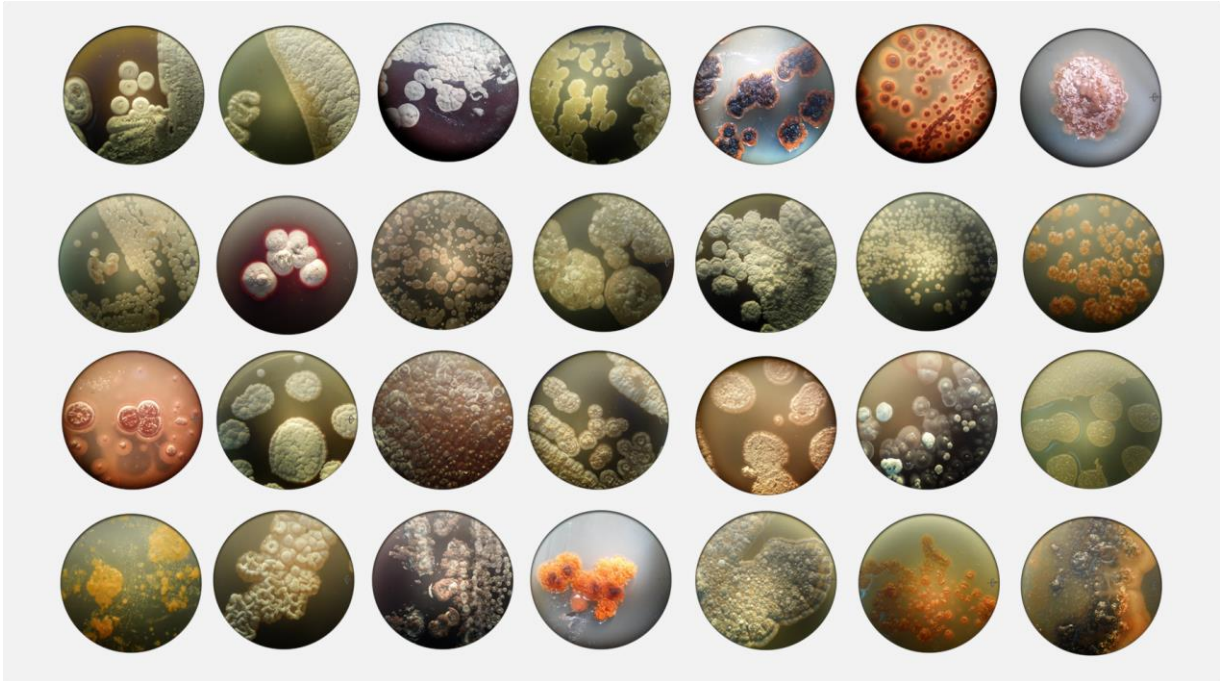


Figura. 7. Morfología de algunas de las colonias aisladas de las muestras de sedimento marino.

En la **Fig. 9** se observa el número de aislamientos por estación, la estación E12 representó el mayor número de actinomicetos aislados. Es importante señalar que cinco cepas no han logrado identificar, debido a que la extracción de su ADN no ha sido exitosa, a pesar de que se han realizado diversas modificaciones en el método de extracción (tiempos de digestión, uso de lisozima, PCR colonial, uso de nitrógeno líquido para una mejor trituración) e incluso se ha cambiado de protocolo (método fenol-cloroformo) y aun así no se ha logrado.

Treintinueve secuencias fueron obtenidas de los 46 aislamientos, sus porcentajes de identidad fueron de 98 a 100% (**Tabla 5**). Las secuencias fueron comparadas con la base de datos del GenBank, los resultados mostraron que los aislamientos pertenecían a cinco géneros, que representan cuatro familias (*Micromonosporaceae*, *Streptomycetaceae*, *Thermomonosporaceae* y *Streptosporangiaceae*). Además otras cuatro cepas sólo fueron identificadas hasta nivel de orden (*Actinomycetales*). El género dominante fue *Streptomyces*, seguido de *Salinispora*, *Actinomadura*, *Nomomurea* y *Micromonospora* (**Fig. 10**).

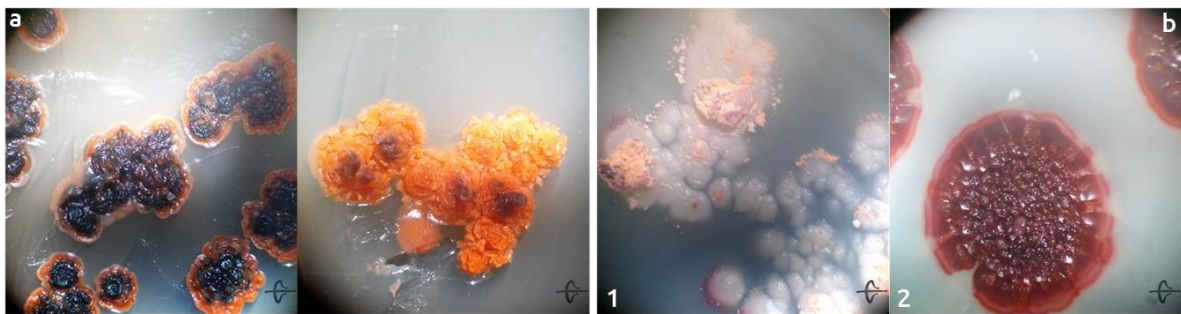


Figura. 8. a) Aislados de tipo *Salinispora*. b) Muestra el desarrollo de una misma colonia en un medio preparado con agua destilada ⁽¹⁾ y otro con agua de mar ⁽²⁾ 28 días después de su inoculación.

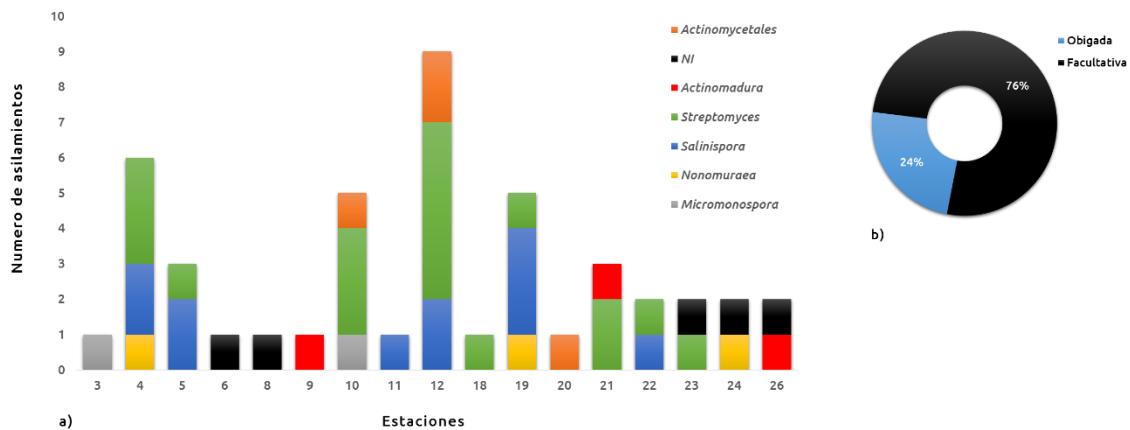


Figura.9. a) Muestra el número de actinomicetos aislados por estación. b) Porcentaje de aislamientos que requieren agua de mar para crecer.

Tabla 5. Identidad de las secuencias de las cepas aisladas comparadas con la base de datos del GenBank.

Código	bp	Actinomiceto	No. Acceso	% identidad	Fuente
LBC09_01	1292	<i>Actinomadura madurae</i>	NR_026343	99	-
LBC21_03	1294	<i>Actinomadura sp</i>	JN896606	99	S
LBC26_02	1165	<i>Actinomadura sp</i>	HQ877425	99	SM
LBC10_05	1300	<i>Actinomycetales bacterium</i>	KM036208	100	SM
LBC12_07	1317	<i>Actinomycetales bacterium</i>	JX457374	99	SM
LBC12_08	1317	<i>Actinomycetales bacterium</i>	JX457374	99	SM
LBC20_02	1316	<i>Actinomycetales bacterium</i>	JX457374	100	SM
LBC03_01	1292	<i>Micromonospora sp.</i>	KJ782566	100	SM
LBC10_01	1292	<i>Micromonospora sp.</i>	EU214969	99	SM
LBC19_01	1297	<i>Nonomurea sp</i>	FJ462360	99	SM
LBC24_01	1295	<i>Nonomurea sp</i>	JX965402	99	S
LBC04_01	1295	<i>Nonomurea sp.</i>	JX965402	99	S
LBC04_02	1293	<i>Salinispora arenicola</i>	HQ873946	100	SM
LBC04_04	1293	<i>Salinispora arenicola</i>	HQ873946	100	SM
LBC05_01	1293	<i>Salinispora arenicola</i>	HQ873946	100	SM
LBC05_02	1293	<i>Salinispora arenicola</i>	HQ873946	100	SM
LBC11_01	1293	<i>Salinispora arenicola</i>	HQ873946	100	SM
LBC12_02	1293	<i>Salinispora arenicola</i>	HQ873946	100	SM
LBC12_03	1293	<i>Salinispora arenicola</i>	HQ873946	100	SM
LBC19_02	1293	<i>Salinispora arenicola</i>	HQ873946	100	SM
LBC19_03	1293	<i>Salinispora arenicola</i>	HQ873946	100	SM
LBC19_04	1293	<i>Salinispora arenicola</i>	HQ873946	100	SM
LBC12_09	1302	<i>Streptomyces malachitospinus</i>	KF554160	100	SR
LBC22_01	1302	<i>Streptomyces malachitospinus</i>	KF554160	100	SR
LBC23_01	1302	<i>Streptomyces malachitospinus</i>	KF554161	100	SR
LBC04_05	1301	<i>Streptomyces sp</i>	KJ934594	100	SA
LBC04_07	1301	<i>Streptomyces sp</i>	KM191340	99	-
LBC05_03	1301	<i>Streptomyces sp</i>	HQ873927	100	SM
LBC10_02	1301	<i>Streptomyces sp</i>	KM191338	100	-
LBC10_03	1301	<i>Streptomyces sp</i>	KM191338	100	-
LBC10_04	1304	<i>Streptomyces sp</i>	KM191341	100	-
LBC12_01	1301	<i>Streptomyces sp</i>	HQ873927	100	SM
LBC12_04	1301	<i>Streptomyces sp</i>	HQ873927	100	SM
LBC12_05	1305	<i>Streptomyces sp</i>	HQ873946	98	SM
LBC12_06	1305	<i>Streptomyces sp</i>	HQ873946	98	SM
LBC18_01	1309	<i>Streptomyces sp</i>	HQ873940	98	SM
LBC19_05	1301	<i>Streptomyces sp</i>	HQ873927	100	SM
LBC21_01	1301	<i>Streptomyces sp</i>	HQ873929	100	SM
LBC21_02	1301	<i>Streptomyces sp</i>	KM191338	100	-

SM: sedimento marino, SA: suelo agrícola, SR: superficie de roca, S: suelo

Se observó una diversidad de 21 especies, la más frecuente de todos los aislados fue *S. arenicola* **Fig. 11**. El árbol filogenético construido se puede ver la figura **Fig. 12**. La alta similitud y los valores del bootstrap sugieren que los aislados representan la misma especie. Las cepas LBC12_05 y LBC18_01 presentaron el porcentaje más bajo de similitud (98%). Además estas cepas se encuentran en una rama distinta a la especie más parecida del GenBank, lo que indica que pertenecen a mismo género pero varían en unos cuantos nucleótidos, por lo tanto, son clasificados como otra especie.

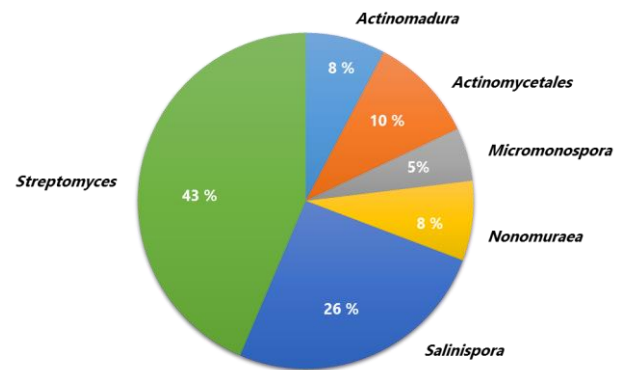


Figura. 10. Representación del porcentaje en los diferentes géneros encontrados en las 39 secuencias analizadas.

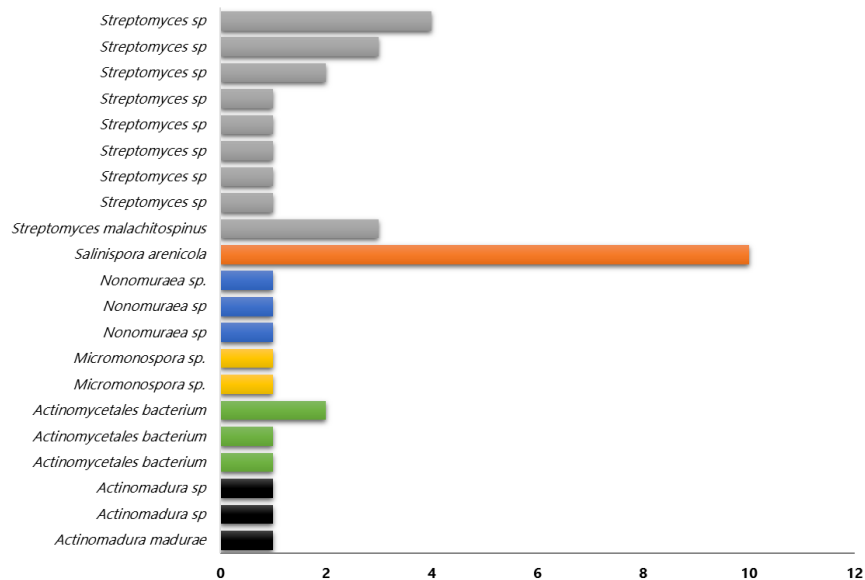


Figura.11. Frecuencia observada de las diferentes especies encontradas en el análisis comparativo de las 39 secuencias.

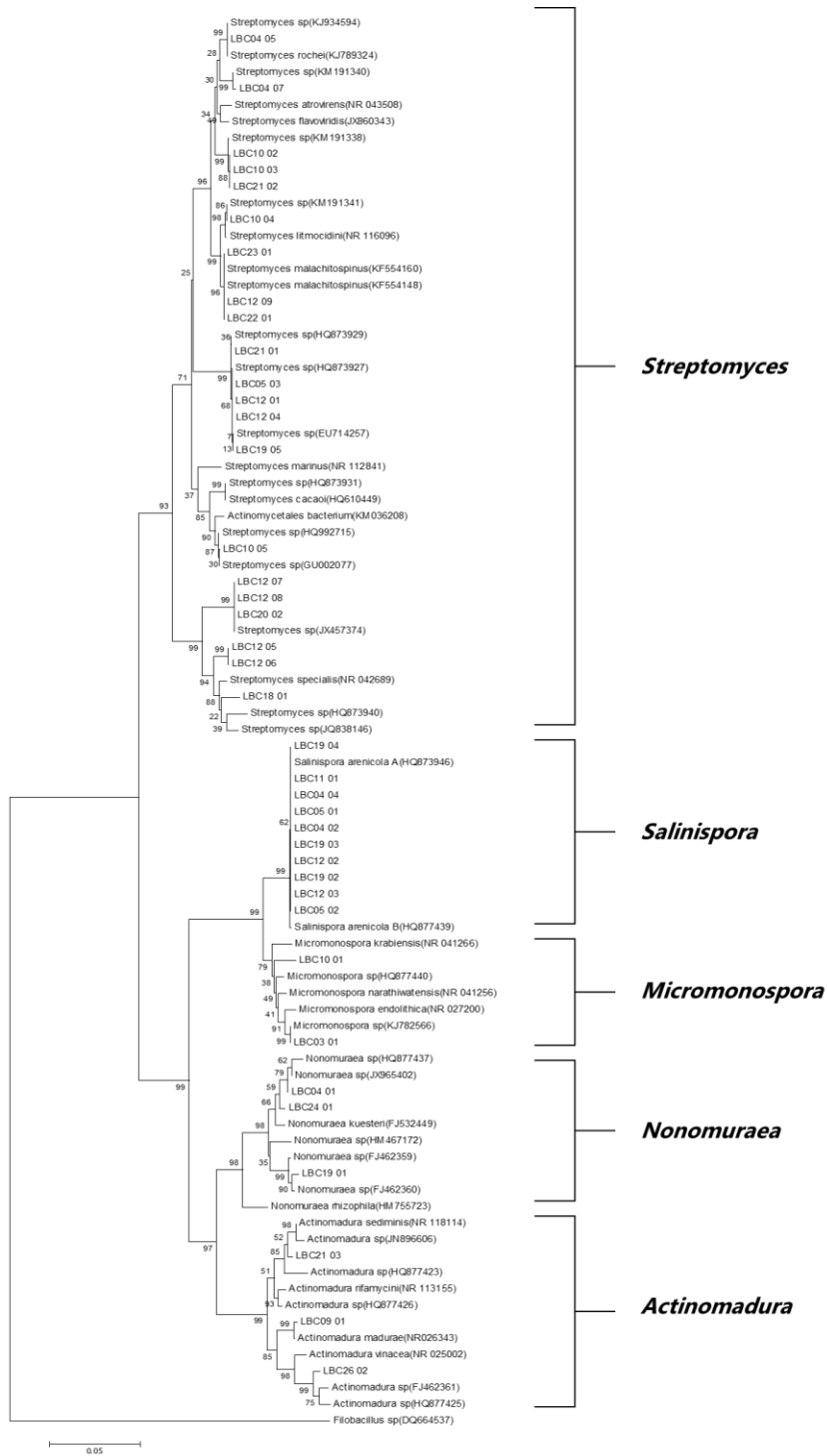


Figura.12. Árbol filogenético con base en el método de Neighbor-Joining de 39 secuencias analizadas. Los números junto a los nodos representan el porcentaje de “bootstrap” obtenido a partir de 1000 réplicas. El grupo externo fue *Filobacillus sp.* (Raíz del árbol). Se pueden observar los cinco géneros encontrados. Las cepas aisladas tienen el siguiente código inicial LBC.

7.2 Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana

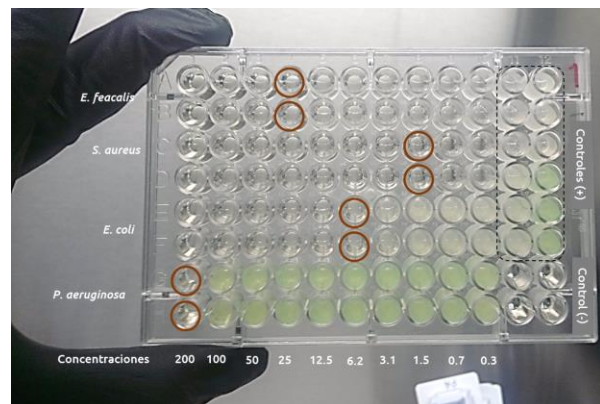
7.2.1 Estandarización del bioensayo

Para el ajuste de la microdilución en caldo, se utilizaron diez concentraciones del antibiótico de referencia la más alta fue de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ y la más baja fue de $0.39 \mu\text{g mL}^{-1}$. Con respecto a la concentración del inóculo utilizado, se contaron en las placas de cultivo de 14-18 UFC, las cuales fueron multiplicadas por el factor de dilución (100000) con un total de 16×10^5 UFC mL^{-1} . Por lo tanto, los $200 \mu\text{L}$ en la microplaca tenía una concentración de $\sim 8 \times 10^5$ UFC mL^{-1} . No se observó, presencia de contaminación al revisar los controles de calidad. La interpretación de los resultados se basó en la observación directa de la turbidez en la microplaca.

Tabla. 6. Concentración mínima inhibitoria de la carbenicilina (CMI) en el ajuste de la técnica de microdilución ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

Microorganismo	ATCC	R	OB
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	2-8	3.1
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	16-64	50
<i>Escherichia coli</i>	11775	4-16	12.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	16-64	200

R: reportada OB: observada



La concentración mínima a la cual el antibiótico tuvo efecto fue de $1.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, por lo tanto su CMI para el caso de *S. aureus* fue de $3.1 \mu\text{g mL}^{-1}$, los resultados las cepas ATCC se pueden observar en la **(Tabla. 6)**. Adicionalmente se leyó la microplaca a una absorbancia de 620 nm para obtener valores de referencia **Fig. 13**. Se consideró como concentración máxima el blanco positivo el cual no tiene carbenicilina, lo que permite que la bacteria puede crecer libremente y el blanco negativo fue el caldo (MHB) sin inóculo.

7.2.2 Evaluación de los extractos

Se analizaron un total de 105 extractos crudos (EAC, EA, EM) que representan a 35 cepas de actinomicetos, los extractos de las cepas del género *Salinispora* fueron reservados para posteriores estudios. El bioensayo realizado mostró que el 51.4% de los extractos fue activo frente a bacterias Gram-positivas en un rango de CMI 7.5 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (**Tabla 7**). Con respecto a las cepas Gram-negativas, ningún extracto presentó actividad sobre estas. El mayor número de extractos activos correspondieron a los obtenidos del pellet extraído en la fracción acetónica. En la **Fig. 14a** se puede observar los porcentajes por género de las bacterias que mostraron actividad antibiótica, estuvieron representados por cuatro géneros y por dos cepas no identificadas (NI). El género *Streptomyces* presentó el mayor número de cepas con actividad observada. El extracto acetónico de la cepa LBC04_07 fue el más bioactivo con valores de CMI de 7.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *E. faecalis* y *S. aureus*, esta concentración fue la más baja observada. La

Tabla 7. Concentración mínima inhibitoria de los extractos de las bacterias que mostraron actividad antibiótica ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

Genero	Código	<i>Enterococcus faecalis</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
		EA	EAC	EM	EA	EAC	EM
<i>Nonomuraea sp.</i>	LBC04_01	-	-	-	125	-	-
<i>Micromonospora</i>	LBC03_01	125	-	-	125	-	-
<i>Actinomadura</i>	LBC26_02	125	-	-	62.5	250	500
NI	LBC24_02	250	-	-	500	-	-
<i>Streptomyces</i>	LBC12_04	62.5	-	-	62.5	-	-
<i>Streptomyces</i>	LBC04_05	15.6	-	-	31.25	-	500
<i>Streptomyces</i>	LBC10_02	125	-	-	500	-	-
<i>Streptomyces</i>	LBC10_03	250	-	-	500	-	-
<i>Streptomyces</i>	LBC10_04	125	-	-	500	-	-
<i>Streptomyces</i>	LBC04_06	500	-	-	62.5	-	500
<i>Streptomyces</i>	LBC05_03	62.5	-	-	62.5	-	-
<i>Streptomyces</i>	LBC12_01	31.25	-	-	31.25	-	-
<i>Streptomyces</i>	LBC04_07	7.8	31.25	62.5	7.8	62.5	125
<i>Micromonospora</i>	LBC10_01	31.2	-	-	62.5	-	-
<i>Actinomycetales</i>	LBC12_08	250	-	-	500	-	500
<i>Streptomyces</i>	LBC12_09	125	-	-	125	-	-
<i>Nonomuraea</i>	LBC24_01	31.25	125	31.25	15.6	125	31.25
<i>Streptomyces</i>	LBC18_01	500	-	-	500	-	-
NI	LBC26_01	62.5	-	-	62.5	-	-
NI	LBC08_01	31.25	-	250	-	-	250
<i>Actinomadura</i>	LBC21_03	62.5	-	-	-	-	-
Total	21	20	2	3	19	3	7

CMI: marcado en negrita

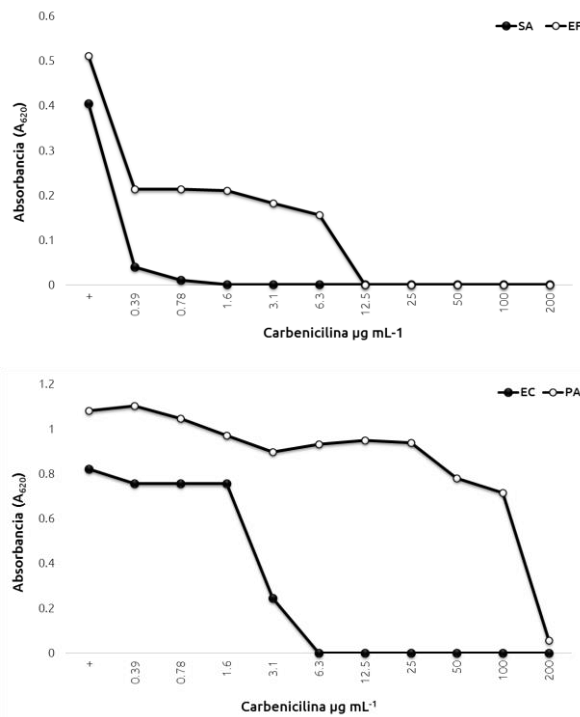


Figura. 13. Muestra los valores obtenidos de la lectura en las diferentes concentraciones. *Staphylococcus aureus* (SA), *Enterococcus faecalis* (EF), *Escherichia coli* (EC), *Pseudomonas aeruginosa* (PA).

cepa LBC4.5 en el extracto acetónico presentó una CIM frente a *S. aureus* de 15.6 y de 31.25 µg mL⁻¹ frente a *E. faecalis* respectivamente.

El extracto metanólico de la cepa LBC24_01 presentó una CIM relativamente baja con valores de 31.25 µg mL⁻¹ frente a *E. faecalis*, y el extracto acetónico con valores de 15.6 µg mL⁻¹. La mayoría de los extractos analizados mostraron ser más activos frente a *E. faecalis* (**Fig. 14b**). Sólo tres extractos de acetato de etilo fueron positivos el valor más bajo observado fue para la cepa LBC04_07 frente a *S. faecalis* con un valor de 31.25 µg

mL⁻¹. Todos los extractos obtenidos de las cepas *Nonomuraea sp.* LBC24_01 y *Streptomyces sp.* LBC04_07 mostraron bioactividad para ambas bacterias patógenas.

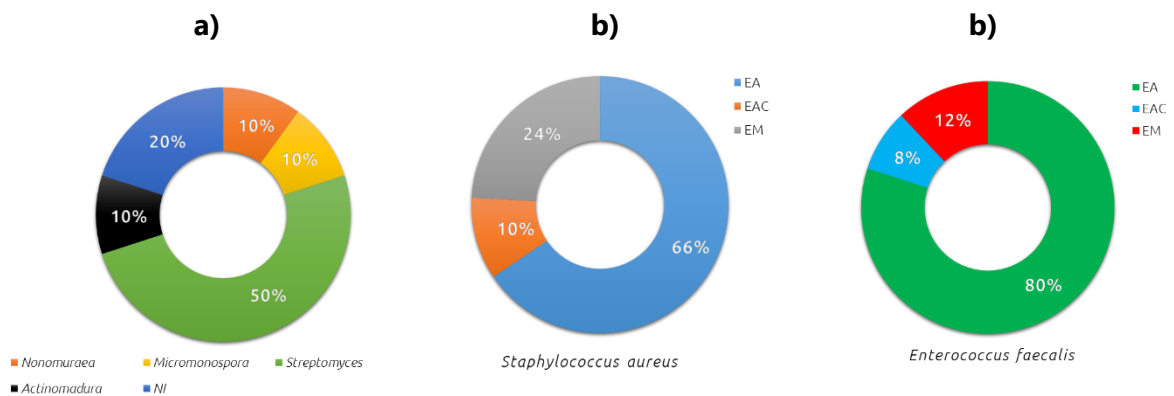


Figura. 14. a) Porcentaje de las cepas a nivel de género que presentaron actividad antibiótica. b) Porcentaje de actividad de los extractos frente a las cepas ensayadas. Extractos: metanol (EM), acetona (EA), acetato (EAC). NI: no identificada.

8. Discusión

8.1 Aislamiento e identificación

En este estudio se aislaron 46 actinomicetos, el porcentaje de aislamiento fue bajo comparado con otros estudios de esta misma zona. Esto puede estar relacionado con el manejo de los sedimentos, cantidad de nutrientes o técnica de inoculación considerando que las muestras se estamparon sólo dos veces y que sólo se utilizó un medio de cultivo. Becerril-Espinosa (2011), utilizó varios medios de cultivo, entre ellos el medio M3 que tiene la misma composición que el M1-10% utilizado, en el que observó un mejor desarrollo de actinomicetos. Uno de sus sitios de estudio fue Loreto que representó el 74.4% de todos sus aislamientos. Recientemente Castro-Ochoa (2014), reporta que el medio M5 compuesto por agar, manitol y casaminoácidos fue el mejor para aislar actinomicetos raros, sin embargo, en la estación de Loreto sólo aisló tres cepas. Es importante mencionar que la mayoría de los sedimentos analizados fueron colectados a profundidades superiores a 200 m, esto es un factor interesante, ya que no siempre es posible igualar las condiciones adecuadas para la recuperación de actinomicetos, debido a las características particulares del medio marino a esa profundidad (p. ej., la presión). Otro dato interesante es la muestra E12 colectada a una profundidad de 56 m que presentó un número mayor de aislados, esto hace suponer que está relacionado con el origen de muestra, más adelante se discute sobre esto. El medio M1-10% ha sido muy utilizado debido a que, los medios bajos en nutrientes son más efectivos para el aislamiento inicial de actinomicetos (Mincer et al. 2005; Gontang et al. 2007). Un medio rico en nutrientes estimula a bacterias de crecimiento rápido, lo que provoca que bacterias de crecimiento lento como los actinomicetos no crezcan. Inicialmente (datos no reportados) se tomaron 10 muestras de los 26 sedimentos y se inocularon en medio agar nutritivo MCD-LAB, Czapek Dox agar y en M1-100% en los dos primeros no se observó crecimiento aparente de actinomicetos, en el último se observó bacterias de crecimiento rápido que llenaron la placa de cultivo en menos de 48 h inhibiendo el crecimiento de otro tipo de bacterias, por lo que se decidió utilizar el M1-100%.

Las características morfológicas observadas en todas las cepas aisladas han sido descritas para la clasificación parcial de bacterias del orden actinomicetales. Las colonias con color anaranjado y con esporas negras que aparecieron en la placa de cultivo, se consideraron como tipo *Salinispora* (Maldonado et al. 2005), fueron abundantes en las estaciones E4, E5 y E6 con 22, 14 y 19 colonias. Las once cepas seleccionadas de tipo *Salinispora* fueron clasificadas como marinas obligadas a través de la prueba de requerimiento de agua marina y posteriormente identificadas como *Salinispora arenicola*.

De acuerdo con el análisis filogenético de las 39 secuencias analizadas se encontraron 21 especímenes que pertenecen a los siguientes géneros *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Salinispora*, *Actinomadura*, *Nonomuraea*. Estos géneros ya han sido previamente reportados en el GC (Maldonado et al. 2009; Becerril-Espinosa et al. 2013). En las placas de cultivo el género *Streptomyces* fue reconocido por desarrollar un micelio ramificado de diferentes colores, fue el más abundante destacando la estación E12, seguida de E10, su abundancia podría estar relacionada con la cercanía a la costa (estas muestras fueron colectada a una profundidad de 56 y 63 m). Se ha reportado que la abundancia de actinomicetos tipo *Streptomyces* es mayor en aguas someras y disminuye con respecto a la profundidad, lo que sugiere que tienen un posible origen terrestre (Jensen et al. 1991). Sin embargo, se han reportado aislamientos en muestras de sedimento a profundidades de 3800 metros (Ward y Bora, 2006) dejando claro la adaptaciones que puede tener este tipo de género. Con respecto al género *Micromonospora* es muy parecido al *Salinispora* ambos prácticamente no desarrollaron micelio aéreo, es reconocido como el segundo género predominante en sedimentos, en este estudio sólo se aislaron dos cepas a 63 y 215 m (**Fig. 8**).

Las colonias opacas o translúcidas, lisas o rugosas con un micelio aéreo poco desarrollo o no visible a 64X fueron consideradas como actinomicetos raros (no-*Streptomyces*), ya que son menos frecuentes de encontrar. El problema de cultivo con las cepas (LBC19_01, LBC24_01 y LBC04_01), puede estar relacionado con el tipo de actinomicetos raros, estos requieren de

otro tipo de nutrientes como la caseína, quitina y ácido húmico para su óptimo crecimiento (Hayakawa y Nonomura, 1987). Estas tres cepas se encontraron en los sedimentos colectados a una profundidad de 286 a 309 m y pertenecen al género *Nonomuraea*, al parecer este género no es muy abundante comparado con otros (Brednoldt et al 2007; Maldonado et al. 2009; Becerril-Espinosa et al. 2013) esto los hace interesante ya que han reportado (Brednoldt et al 2007) la presencia policétido sintetasa (PKSI) y péptido sintetasa no ribosomal (NRPS) involucrados en la síntesis de metabolitos secundarios. Este hecho, se podría demostrar con la cepa LBC24_01 que presentó actividad con el ensayo antibacteriano realizado. Otra cepa interesante, es *Actinomadura madurae* LBC09_01 aislada de sedimentos colectados a 238 m, esta especie pertenece a un grupo de microorganismos de interés clínico debido a que causan una enfermedad llamada actinomicetoma (no es muy común) que afecta la piel, el tejido subcutáneo y óseo (Barrón et al. 2011). No se encontraron reportes de aislamientos de esta especie en medio marino, la estación de colecta está relativamente cerca de la costa por lo que su origen puede ser terrestre. Sin embargo, esta cepa no se desarrolló bien cuando se cultivó en M1-100% preparado con agua destilada.

El 24% de los aislamientos encontrados pertenecieron al género *Salinispora arenicola* de acuerdo con las características descritas para este género y con el análisis del gen 16S ARNr. El descubrimiento del género *Salinispora* ha generado el interés en diversas líneas de investigación. Originalmente la primera cepas fue aislada de las Bahamas e identificadas a través del gen 16S ARNr, actualmente cuenta con tres géneros descritos *S. tropica* y *S. arenicola*, (Maldonado et al. 2005) y *S. pacifica* (Jensen y Mafnas, 2006). La distribución de las dos últimas es amplia, se han encontrado en Hawaii, Islas Virginias, Mar Rojo, Gran Barrera de arrecife, Guam, Palau, Mar del sur de China, Fiji Costa rica y el Golfo de California, que es el único sitio donde se han encontrado dos filotipos "A y B". La especie *S. tropica* está restringida a las Bahamas (Freel et al. 2012). En este estudio sólo se aislaron *S. arenicola* filo tipo A, esto puede estar relacionado al método de aislamiento ya que en las placas de cultivo donde aparecieron

varias colonias de tipo *Salinispora* sólo se aislaron dos por caja, esto redujo la probabilidad de encontrar el filo tipo B.

8.2 Actividad antibacteriana

Los compuestos antimicrobianos representan una importante aplicación para el tratamiento de las enfermedades infecciosas sobre todo con los patógenos multiresistentes a medicamentos (RMD). *Staphylococcus aureus* es el principal patógeno RMD hay dos tipos de cepas de interés clínico *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) y *S. aureus* resistente vancomicina (SARV). SARM causan miles de infecciones anuales, el problema con VRSA es más preocupante ya que los tratamientos son escasos. Actualmente, los actinomicetos marinos están reconocidos por su alto potencial para generar metabolitos secundario con diversas propiedades biológicas, esto se ve reflejado en nuevos compuestos Salinosporamida A (Feling et al. 2003), Abisomicina C (Riedlinger et al. 2004), Arenomicina (Asolkar et al. 2010). En este estudio, se continúa comprobando que los extractos derivados de actinomicetos marinos proporciona una buena fuente para el descubrimiento de antibióticos. Sin embargo, al parecer los extractos obtenidos no son de amplio espectro ya que las bacterias Gram-negativas fueron resistentes a todos. Estos resultados corroboran las bajas perspectiva en la búsqueda de nuevos antibióticos para patógenos Gram-negativos, debido a sus múltiples mecanismos de resistencias (p. ej., bombas expulsoras del antibiótico). Un patrón parecido fue recientemente reportado, con un nuevo compuesto Xinghiamine A (Jiao et al. 2013) aislado de *Streptomyces xinghaiensis*, el compuesto purificado presentó una buena actividad antibiótica principalmente frente a *S. aureus* con valores de 0.69 μM . Sin embargo, no fue buena contra *P. aeruginosa*, reflejando la resistencia de esta bacteria.

De acuerdo con el CLSI la CMI reportada para la carbenicilina es de 2-8 para *S. aureus* y 16-64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *E. faecalis*. El extracto acetónico aislado de *Streptomyces sp.* LBC04_07 fue efectivo contra *S. aureus* y *E. faecalis* ya que inhibió su crecimiento a una concentración de 3.9-7.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$. El extracto acetónico de *Nonomuraea sp.* LBC24_01 solo fue activo frente a *S.*

aureus 7.8-15.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$, esto es interesante si consideramos que el crecimiento de esta cepa fue bajo comparada con otras, lo que podría indicar que si se utilizan las condiciones apropiadas para un buen crecimiento la producción de metabolitos podría incrementar y tal vez podría ser más bioactiva e incluso podría generar otro tipo de compuestos. Con estos datos obtenidos se puede considerar que en ambos extractos descritos anteriormente fueron sensibles. Es importante señalar que todos los extractos utilizados son crudos, por lo que se requiere de su aislamiento, para comprobar su eficiencia ya que la bioactividad puede cambiar en el proceso de purificación.

Está bien documentada (Bérdy, 2005) la capacidad de los actinomicetos como productores de una gran cantidad de metabolitos secundarios de importancia médica, principalmente como antibióticos donde destacan los géneros *Streptomyces* y *Micromonospora*, en este estudio la mayoría de las cepas aisladas de ambos géneros presentaron una moderada bioactividad. Los géneros *Nonomuraea* y *Actinomadura*, está considerado parte de los actinomicetos raros, la cepa *Nonomuraea sp.* LBC24_01 fue aislada de una muestra de sedimento colectada a una profundidad de 309 m por lo que está sometida a condiciones extremas. De acuerdo con la búsqueda en diferentes fuentes, no, se ha encontrado reportes de compuestos de origen marino producidos por este género, sólo se han reportado aislamientos para el GC a, 310 y 20 m de profundidad (Maldonado et al. 2009; Becerril-Espinosa et al. 2013). Este último autor señala que la única cepa que aisló de este género presentó bioactividad frente a la línea celular HCT-116 sin mostrar valores. Esto sugiere que el compuesto que presenta el extracto, podría ser una oportunidad para el aislamiento de un nuevo compuesto.

Las cepas y los extractos que no presentaron bioactividad seguirán siendo consideradas de interés debido a dos factores; primero la generación de metabolitos dependen de muchos factores que van desde la cantidad de nutrientes utilizados, el tiempo de incubación, hasta la velocidad de agitación. Segundo, sólo se probaron como agente antibacteriano, existen

muchas pruebas a las que pueden ser sometidos: antifúngico, anticancerígeno, antitumoral, antiinflamatorio, antimalaria, antiviral, antioxidante y citotóxico.

9. Conclusiones

En este estudio a partir de 26 muestras de sedimento marino de Loreto BCS se lograron aislar 46 cepas de actinomicetos. Algunas de las cepas aisladas presentaron un mejor crecimiento en el medio preparado con agua marina. Sólo se lograron secuenciar 39 cepas que representan 21 especies distribuidas en cinco géneros diferentes, el género dominante fue *Streptomyces* seguido de *Salinispora*. Las cepas que no se han logrado identificar siguen en proceso de identificación.

En cuanto a la bioactividad, el 54% de los extractos probados reflejaron un efecto antibacterial frente a bacterias Gram-positivas, especialmente frente a *E. faecalis*. A pesar de que no todos los extractos producidos por las diferentes cepas fueron activos, es necesario seguir probándolos frente a otros agentes patógenos o líneas celulares de cáncer. Se está llevando a cabo el análisis químico del extracto producido por *Streptomyces sp.* LBC04_07 con el fin de identificar el o los compuestos responsables de la actividad antibacteriana.

El ensayo antibacteriano desarrollado en este estudio representa un método eficiente para determinar el potencial antimicrobiano de los metabolitos derivados de actinomicetos marinos.

Este estudio reporta por primera vez una cepa *Nonomuraea sp.* LBC24_01 aislada del medio marino con actividad antibiótica.

10. Referencias

- Abdel-Mageed WM, Milne BF, Wagner M, Schumacher M, Sandor P, Pathom-aree W, et al. 2010.** Dermacozines, a new phenazine family from deep-sea dermacocci isolated from a Mariana Trench sediment. *Org Biomol Chem.* 8 (10):2352–62.
- Abdelmohsen UR, Pimentel-Elardo SM, Hanora A, Radwan M, Abou-El-Ela SH, Ahmed S, et al. 2010.** Isolation, phylogenetic analysis and anti-infective activity screening of marine sponge-associated actinomycetes. *Mar Drugs.* 8 (3):399–412.
- Ahmed L, Jensen PR, Freel KC, Brown R, Jones AL, Kim BY, Goodfellow M. 2013.** *Salinispora pacifica sp. nov.*, an actinomycete from marine sediments. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 103 (5):1069–78.
- Aljanabi, S.M., y I. Martinez. 1997.** Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research.* (25):4692–4693.
- Asolkar RN, Jensen PR, Kauffman CA, Fenical W. 2006.** Daryamides AC, weakly cytotoxic polyketides from a marine-derived actinomycete of the genus *Streptomyces* strain CNQ-085. *J Nat Prod.* 69 (12):1756–9.
- Asolkar R.N, Kirkland, T.N, Jensen, P.R, Fenical, W. 2010.** Arenimycin, an antibiotic effective against rifampin- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *J Antibiot (Tokyo).* (6)3:37–39.
- Barrón-Tapia MT, Araiza J, Aguilar-Estrada L, Pérez- Mercadillo P, Saúl A, Bonifaz A. 2011.** Actinomycetoma por *Actinomadura pelletieri*. *Dermatología Rev Mex.* 55(4):223-228
- Becerril-Espinosa A, Guerra-Rivas G, Ayala-Sánchez N, Soria-Mercado IE. 2012.** Antitumor activity of actinobacteria isolated in marine sediment from Todos Santos Bay, Baja California México. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* (47):317–325.
- Becerril-Espinosa, A. 2011.** Actinobacterias aisladas del sedimento marino del Golfo de California y de Bahía Todo Santos: diversidad, bioactividad y dominios cetosintetasa. 2011. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Baja California.
- Becerril-Espinosa, A, Freel, K.C., Jensen, P.R., Soria-Mercado, I.E. 2013.** Marine actinobacteria from the Gulf of California: diversity, abundance and secondary metabolite biosynthetic potential. *Antonie van Leeuwenhoek.* (103):809–819.
- Bentley S, Chater K, Cerdeno-Tarraga A-M, Challis G, Thomson N, James K, et al. 2002.** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Nature.* 417 (6885):141–7.
- Berdy J. 2005.** Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot.* 58 (1):1–26.
- Bibb MJ. 2005.** Regulation of secondary metabolism in streptomycetes *Curr Op Microbiol.* (8):208–215.

Bode HB, Bethe B, Höfs R, Zeeck A. 2002. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chembiochem.* 3 (7):619–627.

Boucher Helen W, Talbot George H, Bradley John S, et al. 2009. Bad bugs, no drugs: No ESKAPE! An update from the infectious diseases society of america. *Clin Infect Dis* 48 (1):1–12.

Bredholdt H, Galatenko O, Engelhardt K, Fjaervik E, Terekhova L, Zotchev S. 2007. Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity. *Environmental Microbiology.* (11):2756–2764.

Bruns A, Philipp H, Cypionka H, Brinkhoff T. 2003. *Aeromicrobium marinum sp. nov.*, an abundant pelagic bacterium isolated from the German Wadden Sea. *Int J Syst Evol Microbiol.* 53 (6):1917–23.

Bull AT, Stach JEM, Ward AC, Goodfellow M. 2005. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie Van Leeuwenhoek.* (87):65–79.

Castro-Ochoa, F. 2014. Actinobacterias raras: evaluación del potencial anticancerígeno y antibacteriano de metabolitos secundarios. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Marinas UABC.

Clardy J, Fischbach AM, Walsh TW. 2006. New antibiotics from bacterial natural products. *Nature.* (24):1541–1550.

Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI. M100-S24. 2014. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement.

Coyle M. 2005. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Departments of Laboratory Medicine and Microbiology. pp 4–224.

Cross T. 1981. Aquatic actinomycetes: a critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats. *J Appl Bacteriol.* (50):397–423.

Crum NF, Lee RU, Thornton SA, et al. 2006. Fifteen-year study of the changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am J Med.* (119):943–51.

Dale-Skinner y Bonev BJ. 2009. New strategies combating bacterial infection: molecular mechanisms of antibiotic resistance: the need for novel antimicrobial therapies. WILEY-VCH Verlag. pp. 1–40.

Dasari VRRK, Muthyala MKK, Nikku MY, Donthireddy SRR. 2012. Novel Pyridinium com-pound from marine actinomycete, *Amycolatopsis alba var. nov.*, DVR D4 showing antimicrobial and cytotoxic activities in vitro. *Microbiol Res.* 167:346–51.

Fauci, A.S., y Morens, D.M. 2012. The perpetual challenge of infectious diseases. *N. Engl. J. Med.* (366):454–461.

Feling RH, Buchanan GO, Mincer TJ, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W. 2003. Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinispora*. *Angew Chem Int.* 42 (3):355–7

Fenical W, Jensen PR, Palladino MA, Lam KS, Lloyd K, Potts BC. 2009. Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). *Bioorg. Med. Chem.* (17):2175–2180.

Fenical W, y Jensen P. 2006. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nat Chem Biol.* (2):666–673.

Fernebro, J. 2011. Fighting bacterial infections – future treatment options. *Drug Resist. Updat.* (14):125–139.

Firn RD y Jones C.G. 2003. Natural products: a simple model to explain chemical diversity. *Nat Prod Rep.* 20:382–91.

Fischbach Michael A y Walsh Christopher T. 2009. Antibiotics for emerging pathogens. *Science.* 325 (5944): 1089–1093.

Freel Kelle C, Edlund Anna y Jense Paul R. 2012. Microdiversity and evidence for high dispersal rates in the marine actinomycete '*Salinispora pacifica*'. *Environmental Microbiology.* 14 (2):480–493.

Freundlich JS, Lalgondar M, Wei JR, Swanson S, Sorensen EJ, Rubin EJ, Sacchettini JC. 2010. The abyssomicin C family as *in vitro* inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.* (90):298–300.

Gao Beile y Gupta R. 2012. Phylogenetic Framework and Molecular Signatures for the Main Clades of the Phylum Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 76(1): 66–112.

Gontang Erin A, Fenical William y Jensen Paul R. 2007. Phylogenetic Diversity of Gram-Positive Bacteria Cultured from Marine Sediments. *Environ. Microbiol.* 73 (10):3272–382.

Grossart HP, Schlingloff A, Bernhard M, Simon M, Brinkhoff T. 2006. Antagonistic activity of bacteria isolated from organic aggregates of the German Wadden Sea. *FEMS Microbiol Ecol.* 47 (3):387–96.

Guillen-Matus D. 2014. Producción de metabolitos secundarios por dos filotipos del actinomiceto marino *Salinispora arenicola*. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Marinas UABC.

Hayakawa M, y Nonomura H (1987). Efficacy of artificial humic acid as a selective nutrient in HV agar used for the isolation of soil Actinomycetes. *J Ferment Technol.* (65):609–616.

Helmke, E. y Weyland, H. 1984. *Rhodococcus marinonascens sp. nov.*, an actinomycete from the sea. *Int. J. Syst. Bacteriol.* (34):127–138.

Hughes CC, Prieto-Davo A, Jensen PR, Fenical W. 2008. The marinopyrroles, antibiotics of an unprecedented structure class from a marine *Streptomyces sp.* *Org Lett.* 10 (4):629–31.

Jensen P.R., Gontang, E., Mafnas C., Mincer T.J., Fenical W. 2005. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environ Microbiol.* (7):1039–1048.

Jensen PR y Mafnas C. 2006. Biogeography of the marine actinomycete. *Environ. Microbiol.* (8):1881–1888.

Jensen PR, Dwight R y Fenical W. 1991. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *App Env Microbiol.* (29):1102–1108.

Jiao W, Zhang F, Zhao X, Hu J, Suh JW. 2013. A Novel Alkaloid from Marine-Derived Actinomycete *Streptomyces xinghaiensis* with Broad-Spectrum Antibacterial and Cytotoxic Activities. *PLoS ONE.* 8(10):1–7.

Kennedy J, Flemer B, Jackson SA, Lejon DPH, Morrissey JP, O’Gara F, et al. 2010. Marine metagenomics: new tools for the study and exploitation of marine microbial metabolism. *Mar Drugs.* 8(3):608–28.

Kutzner H. 1968. Über die bildung von huminstoffen durch streptomyceten. *Landwirtsch Forsch.* (21):48–61.

Kwon HC, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W. 2006. Marinomycins A–D, antitumor-antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus "*Marinispora*". *J Am Chem Soc.* (128):1622–1632.

Kwon HC, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W. 2009. Marinisporolides, polyene-polyol macrolides from a marine actinomycete of the new genus *Marinispora*. *J Org Chem.* 74 (2):675–84.

Lam, K.S. 2009. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Opinion in Microbiology.* (9):245–251.

Maldonado L, Fragoso-Yáñez D, Pérez-García A, Rosellón-Druker J, Quintana E. 2009. Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico. *Antonie Van Leeuwenhoek.* (95):111–120.

Maldonado L.A, Stach J.E.M, Pathom-aree W., Ward A.C., Bull A.T, Goodfellow M. 2005b. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments *Antonie van Leeuwenhoek.* (87):11–18

Maldonado LA, Fenical W, Jensen PR, Kauffman CA, Mincer TJ, et al. 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.

Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim SK. 2013. Marine actinobacterial metabolites: current status and future perspectives. *Microbiological Research*. (168):311–332.

Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim SK. 2014. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine Actinobacteria. *Microbiological Research*. (169):262–278.

Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim SK. 2013a. Introduction to marine actinobacteria. *Marine Microbiology: Bioactive Compounds and Biotechnological Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. pp 1–12.

Mincer TJ, Fenical W, Jensen PR. 2005. Culture-dependent and culture-independent diversity within the obligate marine actinomycete genus *Salinispora*. *Appl Environ Microbiol*. 71 (11):7019–28.

Mincer, T.J, Jensen, P.R, Kauffman, C.A. y Fenical, W. 2002. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Appl. Environ. Microbiol*. (68):5005–5011.

Miranda Novales, María G. 2011. Resistencia antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* en México. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*. 68 (4):262–270.

Montaser R y Luesch H.2011. Marine natural products: a new wave of drugs?. *Future Med Chem*. 3 (12):1475–1489.

Munro M.H.G, Blunt J.W, Dumdei E.J, Hickford S.J.H. 1999. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *J. Biotechnol*. (70):15–25.

Nathan C. 2004. Antibiotics at the crossroads. *Nature*. (431):899–902.

Peleg, Anton Y, Hooper, David C. 2010. Hospital-Acquired infections due to Gram-negative bacteria. *N Engl J Med*. (362):1804–1813.

Penn K, Jenkins C, Nett M, Udway DW, Gontang EA, McGlinchey RP, et al. 2009. Genomic islands link secondary metabolism to functional adaptation in marine actinobacteria. *ISME J*. 3 (10):1193–203.

Radecka Iza, Martin Claire y Hill David. 2015. The Problem of microbial drug resistance. *Novel Antimicrobial Agents and Strategies*, First Edition. Wiley-VCH. pp 1–13.

Rathna Kala R, Chandrika V. 1993. Effect of different media for isolation, growth and maintenance of actinomycetes from mangrove sediments. *Ind J Mar Sci*. 22 (4):297–299.

Riedlinger J, Reicke A, Zähler H, Krismer B, Bull AT, et al. 2004. Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucosisspora* strain AB-18-032. *J. Antibiot*. 57:271–279.

Rodicio Mdel R y Mendoza Mdel C. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 22(4):238–45.

Saitou N. and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4:406-425.

Sanchez S, Demain AL. 2002. Metabolic regulation of fermentation processes enzyme. *Microb Technol.* (31):895-906.

Solanki, R., M. Khanna and R. Lal. 2008. Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian J. Microbiol.* (48):410-431.

Soria-Mercado IE, Prieto-Davo A, Jensen PR, Fenical W. 2005. Antibiotic terpenoid chloro-dihydroquinones from a new marine actinomycete. *J Nat Prod.* 68 (6):904-10.

Sujatha P, Bapi Raju K, Ramana T. 2005. Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Res.* 160 (2):119-26.

Suthindhiran Krish, Kannabiran, Krishnan. 2010. Diversity and exploration of bioactive marine actinomycetes in the Bay of Bengal of the Puducherry coast of India *Indian J Microbiol.* 50 (1):76-82.

Tamura K. 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution.* 9:678-687.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution.* 30:2725-2729.

Torres-Beltran M, Cardoso-Martines F, Millan-Aguiñaga N, Becerril-Espinoza A, Soria-Mercado IE. 2012. Evaluación del golfo de California como una fuente potencial de actinobacterias marinas bioactivas. *Ciencias Marinas.* 38 (4): 609-624

Udwary DW, Zeigler L, Asolkar RN, Singan V, Lapidus A, Fenical W, et al. 2007. Genome sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycetes *Salinispora tropica*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104 (25):10376-81.

Valli S, Suvathi SS, Aysha O, Nirmala P, Vinoth KP, Reena A. 2012. Antimicrobial potential of actinomycetes species isolated from marine environment. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2 (6):469-73.

Ventura M, Canchay C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald G, et al. 2007. Genomics of actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (3):495-548.

Villarreal-Gómez LJ, Soria-Mercado IE, Guerra-Rivas G, Ayala-Sánchez NE. 2010. Antibacterial and anticancer activity of seaweeds and bacteria associated with their surface. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* (45):267-275.

Ward AC, Bora N. 2006. Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Curr Opin Micro biol.* 9 (3):279–286.

Williams D.H, Stone M.J, Hauck P.R, Rahman S.K. 1989. Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? *J Nat Prod.* (52):1189–208.

Williams PG, Miller ED, Asolkar RN, Jensen PR, Fenical W.2007. Arenicolides AC. 26-membered ring macrolides from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *J Org Chem.* 72 (14):5025–34.

Woese, Carl R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* 51 (2): pp. 221–271.

Wright, Gerard D 2011. Antibiotics: A New Hope. *Chemistry & Biology.* 9 (1):3–10.