

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



**“BÚSQUEDA DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN MACROALGAS Y
BACTERIAS MARINAS MEDIANTE MÉTODOS DEPENDIENTES Y
NO DEPENDIENTES DE CULTIVO”.**

T E S I S

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

**MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

LUIS JESÚS VILLARREAL GÓMEZ

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

“BÚSQUEDA DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN MACROALGAS Y
BACTERIAS MARINAS MEDIANTE MÉTODOS DEPENDIENTES Y
NO DEPENDIENTES DE CULTIVO”.

TESIS

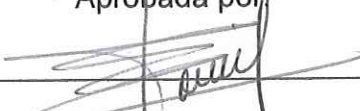
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGIA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGIA

PRESENTA

LUIS JESÚS VILLARREAL GÓMEZ

Aprobada por



Dra. Irma Esthela Soria Mercado

Director de tesis



Dr. Luis Manuel Enriquez Paredes

Sinodal



Dra. Graciela Guerra Rivas

Sinodal

DEDICATORIA

A Dios en primer lugar, por su eterno amor y su paciencia hacia mí, por amor a El seré un buen hombre, un buen padre, un buen esposo y un buen investigador.

A mi hija Yosseline y a mi esposa Lizeth, ya que sin ellas compartiendo este logro esto no tendría sentido, ellas son la esencia de mi esfuerzo, el motor de mi corazón, la luz de mi camino, las amo y por ellas cruzaría mares, escalaría montañas, viajaría de una ciudad a otra todos los días solamente para que estén orgullosas del hombre que daría su vida por ellas.

A la Dra. Lourdes Aldana Madrid, quien me enseñó el camino, a entregar lo mejor de mí, por mostrarme lo que llegaré a ser... un investigador. A la Sra. Claudina quien me ayudó cuando más lo necesitaba, la promesa sigue en pie regresaré a Hermosillo a enseñarle mi título de Doctorado.

AGRADECIMIENTOS

Le doy primero gracias a Dios por darme la vida y por hacerme feliz en ella, por darme una hermosa familia que me ama, ellas son la razón de mi empeño por ser mejor, por seguir estudiando para llegar a ser alguien que pueda impactar la vida de otras personas con mi trabajo, te amo mi Yossie, te amo Lizeth. Le doy gracias a la Dra. Irma Soria por dirigir esta tesis, y por su eterna paciencia hacia mí, su confianza y su cariño, me ayudaron a realizar este enorme trabajo, gracias por darme la oportunidad, no pude haber tenido una mejor directora de tesis. Al Dr. Luis Enríquez por todo el tiempo que me otorgaste y por tus enseñanzas, sin tu asesoría no se que hubiera hecho, en mi opinión eres el mejor maestro que he tenido desde la primaria. Le agradezco a la Dra. Graciela Guerra por su asesoría y por revisar mi tesis. A la Dra. Alejandra Prieto Davo, que fue una pieza fundamental en la realización de la segunda parte del trabajo, aprendí muchísimas cosas trabajando contigo, sobre todo a disfrutar de la vida. Al Dr. Paul Jensen, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por apoyarme en la realización de una publicación con el nombre de SCRIPPS en ella.

Le agradezco al Dr. Alexei Licea y a su equipo, por dejarme realizar los bioensayos en su laboratorio. A la QFB. Mónica Ritchie por facilitarme las bacterias patógenas usadas en los bioensayos. Al Oceanólogo Raúl Aguilar por su asesoría en la identificación de las algas marinas. Le doy gracias a la Facultad de Ciencias Marinas por becarme para la realización de la estancia de investigación en SCRIPPS. Le doy gracias a mis jefes Masamishi Matsushita y Joao Mesashi

del restaurante "RA sushi- bar" donde trabajo por no despedirme por llegar tarde y por darme el horario conveniente para ir a la escuela, sin su ayuda, mis estudios de Maestría hubieran sido 10 veces más difícil, muchas gracias. A Eva Luz, Dila, Fabiola, Natalie, Micki y Amayali, por sus consejos y amistad, todos estamos en el mismo barco. Le doy gracias a mis hermanos Blanquita, Wendy y José Luis, por ser tan buenos conmigo, a pesar de estar lejos, espero estén orgullosos de mí. Le doy gracias a mis amigos Obed, Eli y Rosalva, por seguir siendo mis amigos, y seguir en contacto a pesar de la distancia, los quiero mucho. A mis amigos del trabajo Rogelio, Fausto, Javier, Joao, Masa, Hugo y Raymundo por su amistad y compañerismo, gracias por creer en mí y preguntarme cosas científicas que nunca se la respuesta, pregúnteme de bacterias no de pescados (uyuyuy!). Le agradezco al programa UC- Mexus 2007, UCSD (Dr. William Fenical) y UABC (Dra. Irma Soria Mercado), por la financiación de este trabajo de tesis. Y por último a ti, por dedicarle tiempo de tu vida en leer estas líneas, gracias.

RESUMEN

Desde hace 150 años, el estudio de la vida microbiana marina ha evolucionado de una manera sorprendente. Iniciando con el aislamiento de bacterias marinas, y el establecimiento de su importancia en ambientes marinos, así como el papel que desempeñan en los ciclos del carbono y los nutrientes. Aunque se ha mejorado la metodología tradicional para investigar a estos microorganismos, los avances en las técnicas moleculares han permitido el estudio de una diversidad más certera y por lo tanto, el descubrimiento de una mayor fuente de productos naturales. Este proyecto ha tomado en consideración la evaluación de actividad antibacterial y anticancerígena de extractos de seis algas marinas de la bahía de Todos Santos, B.C., y sus bacterias asociadas. Consecutivamente, se ha realizado un estudio de diversidad de bacterias marinas de dos familias de actinomicetos (*Streptomycetaceae* y *Micromonosporaceae*), ya que los diferentes miembros de estas familias han demostrado ser excelentes productores de compuestos bioactivos. Los ensayos antibacterianos y anticancerígenos fueron desarrollados utilizando un método de dilución, empleando las cepas patógenas para el hombre *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas aeruginosa* para el ensayo antibacterial y las células de cáncer colorectal HCT-116 para el ensayo anticancerígeno. Para el estudio de diversidad de las dos familias de actinomicetos, se tomaron muestras de sedimentos marinos cerca de la costa de San Diego, Ca., En total se obtuvieron 35 cepas bacterianas aisladas de la

superficie de las algas marinas, pertenecientes a las familias de *Firmicutes*, *Proteobacterias* y *Actinobacterias*. En el ensayo anticancerígeno, la cepa Cc51 aislada del alga *Centroceras clavulatum* mostró actividad citotóxica con un IC₅₀ de 6.492 µg ml⁻¹. La cepa Sm36 aislada del alga *Sargassum muticum* mostró una actividad de 5.531 µg ml⁻¹ mientras que la cepa Eb46 aislada del alga *Enderachne binghamiae* mostró la mayor actividad anticancerígena dando un IC₅₀ de 2.843 µg ml⁻¹ cuando se evalúan a una concentración de 10 mg ml⁻¹ en DMSO. Esto nos indica que las bacterias asociadas a las macroalgas marinas estudiadas, producen compuestos capaces de inhibir el crecimiento de células de cáncer colorectal HCT-116 e inhibir el crecimiento de la bacteria Gram negativa *Proteus mirabilis*. En lo que respecta al estudio de diversidad, se encontraron clones con una similitud alta al género *Salinispora*, el cual es productor de metabolitos secundarios y se reporta por primera vez, clonas de la especie de *Catellatospora sp.*, en muestras de sedimentos marinos. En conclusión, el estudiar en conjunto la diversidad microbiana no dependiente de cultivo y el diseño adecuado de cebadores, ayuda a diseñar un mejor proyecto de investigación que garantice resultados satisfactorios. Los métodos tradicionales de cultivo no deben ser reemplazados, ni ser considerados inapropiados para los estudios de diversidad y búsqueda de nuevas sustancias bioactivas, ya que al conocer previamente la diversidad microbiana presente en determinado tipo de muestra, el investigador puede inferir el tipo de compuestos químicos que podrían estar presentes en la muestra.

TABLA DE CONTENIDO

Página de firmas	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Resumen	vi
Tabla de contenido	viii
Lista de figuras	xii
Lista de tablas	xiii
Presentación	1
Capítulo 1. Estudio de diversidad microbiana dependiente de cultivo y su importancia en la obtención de compuestos bioactivos	4
Introducción	4
Antecedentes	7
Distribución e importancia económica de algas marinas	7
Algas marinas como productoras de metabolitos secundarios	10
Bacterias asociadas a las algas marinas	14
Bacterias marinas como productoras de metabolitos secundarios	15
Interacciones entre especies bacterianas	18
Técnicas de diversidad microbiana dependientes de cultivo	20
Objetivo general	22
Objetivos específicos	22
Hipótesis	22
Materiales y métodos	23
Colección de muestras	24
Aislamiento de las cepas bacterianas	26
	viii

Morfología macroscópica y tinción de Gram	26
Purificación de ADN total	26
Determinación de la concentración de ADN total	27
Amplificación del gen 16S ADN ribosomal	27
Secuenciación	28
Análisis filogenéticos	28
Curvas de crecimiento y preparación de extractos crudos	28
Preparación de extractos algales	29
Ensayos biológicos	30
Actividad citotóxica	30
Actividad antibacteriana	31
Cálculo de la dosis letal media DL ₅₀	32
Resultados	34
Identificación de cepas bacterianas	34
Morfología macroscópica	35
Diversidad bacteriana presente en macroalgas marinas	37
Ensayos biológicos	41
Discusión	44
Morfología macroscópica	45
Diversidad bacteriana cultivable en macroalgas marinas	47
Actividad anticancerígena	50
Actividad antibacteriana	51
Conclusiones	53
Literatura citada	
Capítulo 2. Estudio de diversidad microbiana no dependiente de cultivo sobre la diversidad de dos géneros de actinomicetos marinos	64

Introducción	64
Diversidad bacteriana en sedimentos marinos	65
Actinomicetos y la Biotecnología	67
Identificación molecular de <i>Streptomycetaceae</i> y <i>Micromonosporaceae</i> en sedimentos marinos	69
Uso de cebadores en estudios de diversidad	73
Objetivo general	75
Objetivos específicos	75
Hipótesis	75
Materiales y métodos	76
Colección de muestras	77
Extracción de ADN genómico microbial	78
Cebadores	78
Diseño de cebadores	79
Amplificación de PCR y clonación	79
Secuenciación	81
Agrupación en OTU'S	81
Análisis filogenético	81
Análisis estadísticos	82
Índice de Simpson	82
Índice de Shannon	83
Resultados	84
Diseño de cebadores	84
Diversidad de actinomicetos en sedimentos marinos	85
Índice de Shannon y Simpson en actinomicetos	89
Diversidad de <i>Streptomyces</i> en sedimentos marinos	90
Índice de Shannon y Simpson en <i>Strptomycetaceae</i>	95

Diversidad de <i>Micromonospora</i> en sedimentos marinos	96
Discusión	100
Diversidad de actinobacterias en sedimentos marinos	102
Índices de Diversidad de Shannon y Simpson para actinomicetos y <i>Streptomyces</i>	103
Diversidad de <i>Streptomyces</i> en sedimentos marinos	105
Diversidad de <i>Micromonospora</i> en sedimentos marinos	107
Conclusiones	110
Literatura citada	112
Conclusión general	118

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Diagrama de flujo de la metodología seguida	23
Figura 2. Zona de colección de las muestras	24
Figura 3. Algas colectadas en la zona costera de la UABC	25
Figura 4. Placa de 96 pozos utilizada para ensayos bioquímicos	30
Figura 5. Relación evolutiva de 58 taxa con clonas secuenciadas utilizando cebadores de bacterias 27F y 1387R en muestras marinas	44

CAPÍTULO 2

Figura 6. Árbol radial mostrando la relación filogenética de los 13 grupos de actinomicetos provenientes de muestras marinas	74
Figura 7. Diagrama de flujo de la metodología seguida	76
Figura 8. Relación evolutiva de 60 taxa con clones secuenciadas utilizando los cebadores generales de actinomicetos Act235 y Act878 en muestras marinas	88
Figura 9. Relación evolutiva de 73 taxa con clonas secuenciadas y cepas cultivables utilizando cebadores específicos de <i>Streptomyces</i> Sm6F y Sm5R en muestras marinas	92
Figura 10. Comparación de clonas con similitud a vecinos marinos y terrestres utilizando cebadores Sm6F y Sm5R en muestras marinas	94
Figura 11. Relación evolutiva de 63 taxa con clonas secuenciadas utilizando cebadores específicos de <i>Micromonospora</i> M2F y A4R en muestras marinas	98

LISTA DE TABLAS

CAPITULO 1

Tabla 1. Géneros de macroalgas que presentan interés económico	9
Tabla 2. Algas marinas productoras de sustancias bioactivas	11
Tabla 3. Macroalgas marinas utilizadas en este estudio, para la búsqueda de actividad antibacteriana y anticancerígena	13
Tabla 4. Microorganismos productores de sustancias bioactivas	17
Tabla 5. Concentración de los extractos contenida en la placa de 96 pozos después de una dilución 1:10	32
Tabla 6. Cepas bacterianas seleccionadas de las 6 diferentes algas marinas	34
Tabla 7. Tinción de Gram de bacterias extraídas de las algas marinas	35
Tabla 8. Morfología macroscópica de las 35 cepas bacterianas	36
Tabla 9. Identidad de secuencias más cercanas a las bacterias aisladas después de la comparación de secuencias con el BLAST de NCBI	38
Tabla 10. Resultados de los ensayos biológicos realizados	42
Tabla 11. Especies bacterianas asociadas a la superficie de las 6 algas marinas seleccionadas en este estudio	49

CAPITULO 2

Tabla 12. Cebadores generales y específicos de familias, para la obtención de clonas de la muestra ambiental SD06-09-4A	78
Tabla 13. Información sobre vecinos más cercanos con las clonas secuenciadas utilizando cebadores generales de Actinomicetos Act235 y Act878 en muestras marinas	86
Tabla 14. Valores de n y N para el cálculo de D, en el índice de Shannon y Simpson para los clonas generales	89
Tabla 15. Índices de Shannon y Simpson para las clonas con los cebadores de actinomicetos Act235 y Act878	90
Tabla 16. Información sobre vecinos más cercanos con las clonas	91

secuenciadas utilizando cebadores específicos de *Streptomyces* Sm6F y Sm5R en muestras marinas

Tabla 17. Total de clonas con similitud a vecinos hipotéticamente marinos y terrestres	93
Tabla 18. Valores de n y N para el cálculo de D, en el índice de Shannon y Simpson para las clonas similares al género <i>Streptomyces</i>	95
Tabla 19. Índices de Shannon y Simpson para las clonas con los cebadores Sm6F y Sm5R en muestras marinas	96
Tabla 20. Información sobre vecinos más cercanos con las clonas secuenciadas utilizando cebadores específicos de <i>Micromonospora</i> en muestras marinas	97
Tabla 21. Índices de Shannon y Simpson para las familias de <i>Actinomicetos</i> y <i>Streptomyces</i>	104

PRESENTACIÓN

Los organismos marinos son una fuente inagotable de sustancias químicas útiles para la elaboración de medicamentos, entre estos organismos encontramos a las algas marinas, capaces de sintetizar una gran variedad de metabolitos secundarios. Por otro lado, las bacterias se han convertido en organismos cruciales en el área biotecnológica, ya que hasta ahora se siguen descubriendo una gran cantidad de compuestos bioactivos a partir de ellas. Por lo tanto, este proyecto ha tomado en consideración la evaluación de bioactividad de extractos de seis algas marinas de la bahía de Todos Santos, B.C., y sus bacterias asociadas. Paralelamente, se presentan los resultados de un estudio de diversidad de bacterias marinas de dos familias de actinomicetos (*Streptomycetaceae* y *Micromonosporaceae*), ya que los diferentes miembros de estas familias han demostrado ser excelentes productores de compuestos bioactivos.

Para el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos es necesario realizar previamente estudios de diversidad, ya que conociendo el tipo de organismos microbianos que residen en cierto tipo de muestra ambiental, es posible diseñar técnicas de cultivo apropiadas para todas las comunidades microbianas presentes en un determinado tipo de muestra. En este proyecto se emplearon dos tipos de metodología en donde puede evaluarse la diversidad presente en algas y sedimentos marinos.

Para ello, este proyecto se dividió en dos capítulos: En el capítulo uno, se usaron los métodos tradicionales de cultivo o estudios de diversidad microbiana

dependientes de cultivo, para evaluar la bioactividad antibacteriana y anticancerígena en bacterias asociadas a la superficie de seis algas marinas abundantes en la bahía de Todos Santos, B.C., así mismo se evaluó la bioactividad de las algas seleccionadas contra células de cáncer colorectal HCT-116 y cuatro bacterias patógenas para el humano. Considerando que con el método tradicional no se hubieran logrado incluir todas las bacterias presentes en la superficie de las algas marinas, ya que no todas las bacterias comparten las mismas necesidades para su crecimiento, como la fuente de carbono, la temperatura, el pH, el tipo de nutrientes, etc, se tomó en consideración la realización del capítulo dos, en donde se emplearon los estudios de diversidad microbiana no dependientes de cultivo basados en técnicas moleculares. En este caso, se utilizaron muestras de sedimentos marinos, los cuales contienen una cantidad enorme de bacterias marinas. Se estudió la diversidad presente de dos familias de actinomicetos importantes en la producción de compuestos bioactivos y la forma en cómo este tipo de estudio puede auxiliar a un mejor diseño de los métodos tradicionales de cultivo y no como única alternativa. El capítulo dos fue realizado en el Centro de Biotecnología Marina y Biomedicina del Instituto Oceanográfico de Scripps, UCSD. San Diego, California, en donde se estudia exhaustivamente ciertas especies de actinomicetos productores de compuestos bioactivos.

Basándose en lo anterior, se concluye que las dos metodologías deben ser utilizadas en conjunto, para obtener resultados más completos, ya que conociendo la diversidad presente en una muestra, es posible diseñar

condiciones de cultivo, más específicos, que ayudarían al investigador a trazar su camino de una manera más precisa, lo que conlleva a resultados más sólidos y en menor tiempo.

CAPITULO 1

Estudio de diversidad microbiana dependiente de cultivo y su importancia en la obtención de compuestos bioactivos.

Introducción

Desde tiempos muy antiguos el ser humano ha buscado su bienestar, satisfaciendo cualquier necesidad, ya sea alimenticia, sexual, social, etc. Una de las necesidades del ser humano es sin duda mantenerse vivo. El miedo a morir y a enfermarse llevaron al hombre a estudiar a todos los organismos que nos rodean, descubriendo que los compuestos químicos presentes en algunos de ellos, podían ser benéficos para el tratamiento de enfermedades. Así comenzó la ciencia de los productos naturales; área de la biotecnología en donde son utilizados seres vivos para el uso y bienestar del hombre. Varios de estos organismos son productores de metabolitos secundarios, los cuales son parte de una gran variedad de compuestos naturales que usa el hombre. Los metabolitos secundarios se definen como compuestos orgánicos, formados como un bioproducto en organismos sin relación directa con el crecimiento, desarrollo y reproducción normal de éstos. Se pueden encontrar algunos ejemplos como las fibras (algodón, seda, lana); combustibles (aceite y gas natural), y medicinas (antibióticos, hormonas, vacunas), etc.

La importancia de encontrar y utilizar dichos metabolitos secundarios puede ser justificada en dos sentidos principales: (1) El de conocer todas las sustancias naturales que pueden ser benéficas para el hombre e (2) Identificar los organismos productores de estas sustancias, para explotarlos de forma

racional, ya que algunos de ellos, pueden ser los únicos portadores de compuestos útiles para combatir enfermedades humanas.

Por lo anterior, es muy importante realizar estudios que identifiquen los organismos que producen metabolitos secundarios bioactivos, para poder estructurar un plan de aprovechamiento y preservación de aquellas especies que representen una fuente potencial para la producción de fármacos en beneficio del hombre, principalmente aquellos obtenidos a partir de bacterias.

Para la identificación de bacterias se conocen actualmente varias metodologías que han aportado gran información en lo que se refiere al estudio de diversidad bacteriana, dos de ellos son ampliamente explicadas en este trabajo. Tradicionalmente, los estudios para caracterizar la diversidad bacteriana en diferentes ambientes se basan en la suposición de que las técnicas de cultivo permiten recuperar la mayor parte de los microorganismos en una muestra (Escalante-Lozada et al., 2004). Sin embargo, únicamente entre el 0.1 y 10% de las bacterias en el ambiente son ahora cultivables (Handelsman et al., 2002; Torsvik et al., 2002).

Se ha propuesto que las bacterias no cultivables son microorganismos filogenéticamente similares a los cultivables, pero en un estado fisiológico que los hace recalcitrantes. La base de esta explicación es que algunas bacterias cultivables pueden convertirse en viables, pero no cultivables en condiciones ambientales adversas, y revertirse a un estado cultivable al restaurarse las condiciones favorables para su crecimiento (McDougald et al., 1998). Por tanto, el 90.0 a 99.9% de las bacterias no cultivables están representadas por su

contraparte cultivable (Rondon et al., 1999). No hay una explicación satisfactoria para entender la baja proporción de bacterias cultivables, y este fenómeno ha sido una seria limitación para estudiar la diversidad microbiana.

Para estudiar la diversidad bacteriana, las técnicas del ADN recombinante permiten superar la limitación de no poder cultivar la mayoría de las bacterias de un ambiente particular, al ser substituido por la capacidad de aislar y caracterizar su material genético presente (Handelsman et al., 2002).

ANTECEDENTES

Distribución e importancia económica de algas marinas

La primera vez que se documentó el uso de las algas marinas fue en 1958 cuando Richardson presentó resultados preliminares en algas del Caribe. Once años más tarde Diaz-Piferrer (1969) publicó 20 especies de algas verdes que mostraron ser útiles en la elaboración de harinas, 20 especies de algas pardas utilizadas en su mayoría como fuente de alginatos, y por último 28 especies de algas rojas empleadas como fuentes de agar y carragenanos. A partir de estas publicaciones, Michanek (1975) realizó un compendio global que incluyen ejemplos de agarofitos y carragenofitos que son utilizados como materia prima en procesos industriales. Las algas marinas han sido cosechadas para su comercialización, principalmente en Belice donde exportan aproximadamente 800 kg (peso seco) anualmente a los Estados Unidos para aplicaciones en la industria farmacéutica y alimenticia. Robledo (1998) reportó la explotación comercial de *Eucheuma isiforme* en Campeche, México durante los años setentas.

Las algas marinas son extensamente usadas como alimento en la costa, este de Asia (Japón, China, Corea, Taiwán y Vietnam), Indonesia, Perú, Canadá, Escandinavia, Irlanda, Wales, Filipinas y Escocia, entre otros lugares. Desde el punto de vista económico las macroalgas marinas representan un importante recurso como alimento e insumo industrial. La costa del Caribe de Colombia cuenta con innumerables especies que tienen un valor económico en

los aspectos básicos de aprovechamiento, como alimento humano, productos medicinales, fertilizantes, fuente de combustible (metano), papel y en la extracción de gomas (ficocoloides o hidrocoloides) (Teas, 2007). Todos estos productos tienen una infinidad de aplicaciones industriales. A pesar de lo mucho que se especula sobre el potencial de las algas como fuente directa de proteínas y productos farmacéuticos, la demanda por ficocoloides será el factor que más influirá la explotación futura de los recursos mundiales de algas marinas. En la tabla 1 se muestran algunas de las algas con interés económico, por lo que justifica su estudio como organismos productores de sustancias químicas aprovechadas por el hombre.

Tabla 1. Géneros de Macroalgas que presentan interés económico (Tomado de Teas, 2007).

Géneros	Alimento humano	Forraje	Abono	Sustancias medicinales	Fuente de Ficocoloides
ALGAS VERDES					
<i>Enteromorpha</i> (5)*	X	X			
<i>Ulva</i> (3)*	X	X		X	
<i>Chaetomorpha</i> (6)*	X			X	
<i>Dyctiosphaeria</i> (2)*	X	X			
<i>Bryopsis</i> (2)*	X				
<i>Caulerpa</i> (13)*	X				
<i>Codium</i> (5)*	X				
<i>Halimeda</i> (8)*					
ALGAS PARDAS					
<i>Dictyota</i> (11)*	X				
<i>Dictyopterresis</i> (4)*	X				
<i>Padina</i> (5)*	X				
<i>Sargassum</i> (8)*	X	X	X	X	Algina
<i>Rosenvingea</i> (3)*	X				
<i>Turbinaria</i> (2)*	X	X	X	X	Algina
ALGAS ROJAS					
<i>Gelidium</i> (3)*	X				
<i>Corallina</i> (1)*				X	
<i>Haliptilon</i> (1)*				X	
<i>Hypnea</i> (4)*	X			X	Carragenano
<i>Centroceras</i> (1)*				X	
<i>Digenia</i> (1)*				X	
<i>Chondria</i> (6)*	X			X	
<i>Laurencia</i> (12)*					Carragenano

* El número a la derecha de cada género indica el número de especies registradas.

Todo lo anterior nos habla de lo importante que son las algas para las industrias alimenticia y farmacéutica, destacando que las algas marinas producen del 70 a 80 % del oxígeno que respiramos. Por otro lado, debido a su

gran importancia han sufrido una gran explotación, aunque algunas de ellas, como las especies de *Sargassum* y *Codium* han sido consideradas especies invasivas por su capacidad de adaptación y su tasa de crecimiento elevado. Es por eso que es indispensable el continuo estudio de las algas marinas ya que son fuente de muchos compuestos bioactivos. Es necesario el cribado químico de todas las especies de algas que existen y sus organismos relacionados, para así establecer las especies importantes que pueden explotarse sin consecuencias o las que deben protegerse.

Algas marinas como productoras de metabolitos secundarios

Las algas así como otros organismos marinos, producen una gran diversidad de metabolitos secundarios. Una especie individual contiene más de 1,000 entidades químicas únicas (o la maquinaria enzimática que se necesita para producir compuestos) (Darias, 1998). A pesar de esto, el número de especies de macroalgas estudiadas alcanza alrededor de un 2% del total conocido; en la actualidad los compuestos químicos caracterizados son aproximadamente dos mil (González y Silva, 2001).

En la tabla 2 se reportan algunos ejemplos de algas marinas registradas como productoras de metabolitos secundarios con bioactividad.

Tabla 2. Algas marinas productoras de sustancias bioactivas.

Alga	Tipo	Actividad	Organismo blanco	Enfermedad	Fuente	Cita Bibliográfica
<i>Macrocystis pyrifera</i>	Verde	Antitumoral Antibacteriana	Ratones Células CHO	Leishmaniasis visceral	Baja California	Boraso, 1997
<i>Caulerpa prolifera</i>	Verde	Antitumoral Antibacteriana	Células Ehrlich	Carcinoma	Mediterráneo (Arena o Fango)	Soliman, 2000
<i>Caulerpa taxifolia</i>	Verde	Antibacteriana	Células SK-N-SH Células HCT-116	Neuroblastoma Cáncer colorectal	Australia, Estados Unidos, Europa	Metcalf, 1976 Fischel, 1995
<i>Scytosiphon lomentaria</i> , <i>Lessonia nigrescens</i> , <i>Laminaria japonica</i> , <i>Sargassum ringgoldianum</i>	Parda	Antitumoral	Células Ehrlich	Carcinoma	Japón	Hiroyuki, 1990
<i>Enteromorpha prolifera</i>	Verde	Antitumoral	Células Ehrlich	Carcinoma	Japón, Buenos Aires, Chubut, Santa Cruz y Tierra del Fuego	Hiroyuki, 1990
<i>Sargassum sp.</i>	Parda	Antitumoral	Sarcoma 180 Células Ehrlich IMC carcinoma	Carcinoma	Mediterráneo, Atlántico nororiental	Fujiihara y Nagumo, 1993
<i>Anadyomene menziesii</i> <i>Anadyomene stellata</i>	Verde	Antibacteriana	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> y <i>Micrococcus luteus</i>	Evenenamiento de comida, Endocarditis	Estados unidos, México	Hodgson, 1984

Este trabajo seleccionó las macroalgas marinas *Egrecia menziesii*, *Codium fragile*, *Sargassum muticum*, *Enderachne binghamiae*, *Centroceras clavulatum* y *Laurencia pacifica*, para la búsqueda de compuestos antibacterianos y anticancerígenos, ya que para estas algas en particular, no se han reportado estudios que evalúan la bioactividad en contra de células de cáncer colorectal HCT-116 y las bacterias patógenas humanas *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Además, es muy importante estudiar los ecosistemas que el hombre tiene de fácil acceso, ya que están en constante contacto con él, por esta razón, si las algas son portadoras de compuestos químicos únicos u organismos microbianos nuevos, es motivo suficiente para desarrollar un plan de preservación para estas especies, así el hombre podría explotarlas con cuidado sin la necesidad de utilizar barcos ni buzos, que pudieran afectar a otros ambientes. Todas las algas seleccionadas además de ser muy abundantes, se encuentran en la costa de la Bahía de Todos Santos, por lo tanto, es posible su recolección a pie en marea baja.

Tabla 3. Macroalgas marinas utilizadas en este estudio, para la búsqueda de actividad antibacteriana y anticancerígena.

Nombre	Bioactividad	Otros usos	Hábitat	Cita Bibliográfica
<i>Egrelia menziesii</i>	Antibacteriana	Fertilizante, detergente, textil, cosméticos, alimento, nieve y medicinas	América del Norte (Baja California, Inglaterra, Columbia, California, Oregon, Queen, Charlotte, Washington)	Round, 1981
<i>Codium fragile (invasiva)</i>	Anticoagulante	Alimento	Baja California, México (Temperaturas muy bajas)	Wallentinus, 2002
<i>Sargassum muticum (invasiva)</i>	Antibacteriana (Fenoles)	Especie invasiva	Desde Noruega al Mediterráneo, Noroeste de América y Japón	Phillips, 1995
<i>Enderachne binghamiae</i>	Propiedades Inmunológicas (contra macrófagos murinos y células T humanas)	Alimento	Islas del Atlántico, América del Norte (California), Sur América (Chile), África (Namibia, Sur África), Asia (China, Japón), nueva Zelandia, Queensland, Islas del Pacífico (Islas Hawaianas)	Huang y Lee, 2005
<i>Centroceras clavulatum</i>	Citotoxicidad de ciertas especies de peces	Alimento, alimento animal, fertilizante	Islas del Atlántico (Ascensión, Islas Canarias, Islas Cape Verde , Islas Salvaje), África (Cameron, Namibia, Pagalu, oeste de África), Baja California, México, Europa (Islas Adriáticas, Baleáricas, Mar Báltico, Inglaterra, Francia, Italia Helgolandia, Netherlands, Noruega, Portugal, Escandinavia, España)	Targett y Mitsui, 1978
<i>Laurencia pacífica</i>	Antibacteriana (Pacifenol) (contra <i>Penicillium brevicompactum</i>)	Investigación de compuestos químicos	California	San-Martin et al., 2008

La tabla 3 muestra una amplia distribución geográfica de algunas de las algas seleccionadas, esto es importante mencionarlo, ya que al encontrar bioactividad en estas especies, las implicaciones en la industria farmacéutica son favorables para muchos de los lugares arriba mencionados.

Bacterias asociadas a las algas marinas

En estos últimos años se han analizado las propiedades bioactivas tanto de las algas marinas como de microorganismos marinos por separado, y en ambos casos se han obtenido resultados positivos. Sin embargo, muchas de las especies de algas marinas al ser recolectadas, frecuentemente vienen acompañadas de varias cepas bacterianas las cuales han sido tomadas del mar junto con las células algales, o se han encontrado como resultado de una contaminación de los cultivos algales (Jasti et al., 2005). Estas poblaciones mezcladas en los cultivos y también en el mar, muestran que las bacterias utilizan sustancias orgánicas secretadas por células algales vivas o muertas. Se ha observado que muchas algas presentan un mayor crecimiento en presencia de bacterias que en su ausencia. Se ha reportado varias especies de algas que necesitan vitaminas para su crecimiento y posiblemente las bacterias son parcialmente responsables de la producción de estas sustancias. Algunas algas marinas son capaces de sintetizar antibióticos, por esta razón se cree que las bacterias también producen sustancias tóxicas (Jasti et al., 2005).

Bacterias marinas como productoras de metabolitos secundarios

Las comunidades microscópicas marinas son las responsables de la variación en la distribución de ciertos elementos químicos en el mar (Sverdrup et al., 1942). Prueba de ello es la capacidad autónoma de los organismos marinos para producir sustancias biológicamente activas que eventualmente acumulan, modifican, secuestran y usan toxinas de otros organismos (Mebs, 2000). Por ejemplo, la palitoxina ha sido encontrada en la mayoría de los animales que se alimentan o asocian con el mayor productor de la toxina, los zoántidos (especie de coral) (Gleibs y Mebs, 1999). No obstante, esta toxina también ha sido encontrada en el dinoflagelado *Ostreopsis siamensis* (Usami et al., 1995), por lo que cabe la posibilidad de que una bacteria sea el productor original de la toxina (aunque no existe hasta el momento evidencia contundente del hecho) (Mebs, 2000).

Un caso más claro es el de las lomaiviticinas a y b. Estas sustancias con potencial antitumoral fueron aisladas por primera vez a partir de calamares, mismos que contienen a la bacteria *Micromonospora lomaivitiensis*. En experimentos posteriores, esta bacteria fue aislada y cultivada en reactores de fermentación para finalmente determinar que la bacteria era el productor real de la lomaiviticina (He, 2001). Albergando la esperanza de que las bacterias marinas sean la fuente real de la mayoría de los compuestos marinos biológicamente activos, el cultivo industrial de estos organismos con miras hacia su aplicación clínica gozaría de una significativa disminución en sus costos tanto de operación como de producción (He, 2001).

Hasta finales de los años 70's se descubrieron más de 50,000 productos naturales a partir de microorganismos marinos. Más de 10,000 son biológicamente activos, entre ellos 8,000 presentan actividades antibióticas y antitumorales (Berdy, 1989; Betina, 1983).

Es por eso, que las bacterias marinas han sido consideradas con frecuencia como productoras de sustancias antibacterianas y anticancerígenas, permitiendo mantener la estabilidad ecológica de los múltiples ecosistemas marinos, como también las interrelaciones entre microorganismos de ambientes epifíticos, inhibiendo a los organismos competidores y patógenos microbianos (Avedaño- Herrera et al., 2005).

Los mecanismos de acción o competencia que se conocen entre estos microorganismos son diversos, incluyendo producción de antibióticos, bacteriocinas, sideróforos, lisosomas, proteasas e incluso la alteración de pH a través de la producción de ácidos orgánicos (Avedaño- Herrera et al., 2005).

Tabla 4. Microorganismos productores de sustancias bioactivas.

Bacteria	Gram	Actividad	Organismo blanco	Enfermedad	Fuente	Cita Bibliográfica
<i>Flavobacterium uliginosum</i>	Negativo	Antitumoral	Células del Sarcoma-180	Tumores virales	Macroalgas (Bahía de Sagami, Japón)	Okami, 1986
<i>Lactococcus lactis</i>	Positivo	Antitumoral	Virus del papiloma Humano tipo 16 (HPV-16)	Cáncer cervical	Diseñado	Bermúdez-Humarán et al., 2005
<i>Staphylococcus aureoverticillatus</i>	Positivo	Antitumoral	Células tumorales	Tumores	Sedimentos marinos	Blunt et al., 2005
<i>Bacillus sp.</i>	Positivo	Antitumoral	Células HCT-116	Cáncer colorectal	Fango cerca del polo Ártico	Zhang et al., 2004
<i>Pseudomonas bromoutilis</i>	Negativo	Antitumoral	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i>	Neumonía, osteítis, artritis, endocarditis, abscesos localizados	Puerto Rico	Burkholder et al., 1966
<i>Chromobacterium marinum</i>	Negativo	Antibacteriana	<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aureginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Neumonía, osteítis, artritis, endocarditis, abscesos localizados	Agua de mar del Pacífico Norte	Anderson et al., 1974
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	Negativo	Antibacteriana (sideróforo)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Bacillus anthracis</i>	Tuberculosis, carbunco (parecida al ántrax)	Agua de Mar	Pfleger et al., 2008

En la tabla 4 se muestran algunos ejemplos de cepas bacterianas con bioactividad y las fuentes donde se obtuvieron. Se puede apreciar las patologías que pueden ser combatidas con base en la obtención de metabolitos secundarios a partir de las diferentes bacterias arriba mencionadas, puntualizando la importancia de estudiar a los microorganismos como fuente ideal de compuestos bioactivos.

Interacciones entre especies bacterianas

No solamente las interacciones alga-bacteria pueden influir en la secreción de sustancias bioactivas, sino las interacciones que existen entre especies bacterianas que habitan el mismo ecosistema. Hay diferentes tipos de interacciones entre especies de bacterias y con otros organismos, estas interacciones pueden ser positivas (metabiosis y simbiosis) y otras negativas (parasitismo, predación y competencia). Por sus altas densidades poblacionales, contenido de nitrógeno y su relativa incapacidad de escapar de predadores, las bacterias han servido como alimento para diversos grupos de organismos. Se cree que existen aproximadamente 3.8 billones de interacciones con microorganismos (Rheinheimer, 1992).

Por lo regular las bacterias han sido consideradas como la presa de muchos organismos, incluyendo las mismas bacterias u otros tipos de microbios. Estudios realizados por Casida (1992) describen el aislamiento de un predador no obligado de bacterias que resisten al cobre. Primero se encontró que era predador de otros predadores no obligados de bacterias, por lo tanto regulaba la población de predadores de bacterias en el suelo. Segundo, después de interactuar con las células de las bacterias de las cuales se alimentaba, se producía un factor de iniciación de crecimiento tóxico y por último, el organismo producía compuestos antibacterianos y antifungales. Bajo condiciones de laboratorio estas características le permitían a la cepa dominar y persistir en períodos de tiempo muy largos.

Otro tipo de interacción que existe entre las bacterias es la competencia, algunas especies de bacterias son eliminadas por otras especies donde los recursos de ese ambiente se encuentran limitados. Algunas bacterias pueden evitar esta competencia produciendo compuestos que impactan negativamente a sus competidores. Por lo general, estos compuestos (antimicrobianos) que son producidos en el ambiente son difíciles de detectar las bacterias que producen antibióticos por ejemplo, deben reproducirse con mayor rapidez a aquéllas que no lo producen. Curiosamente, algunas de las especies que poseen una de las tasas más lentas de crecimiento que existen, son altas productoras de antibióticos como en el caso de las especies de actinomicetos (Rheinheimer, 1992).

Algunas especies de plantas producen compuestos antimicrobianos o alteran el pH de su superficie, lo que les permite mantener sus superficies limpias de hongos o bacterias. En algunos casos las algas disuelven sustancias orgánicas, las cuales sirven de nutrientes para los microbios, sin embargo, algunas de las bacterias no obtienen nutrientes de las algas u otros animales, sino que se encuentran adheridos a ellos sólo para usarlos como un soporte físico y obtener los nutrientes del ambiente que los rodea (Rheinheimer, 1992).

Existe otro tipo de interacciones entre bacterias en donde ambas especies pueden resultar beneficiadas. Tal es el caso de *Escherichia coli* y *Proteus vulgaris*, en donde estas dos especies pueden coexistir en un medio rico en lactosa y urea. En este caso, *Escherichia coli* degrada a la lactosa y *Proteus vulgaris* no, y solamente *Proteus vulgaris* degrada a la urea. Los productos

finales de estas degradaciones, pueden ser usados por el otro organismo como fuente de carbono y nitrógeno (Rheinheimer, 1992).

Todas estas interacciones influyen positivamente en la producción de sustancias bioactivas en los organismos, estudiando la gran diversidad de especies bacterianas y conociendo sus interacciones con otras especies, puede facilitarse la búsqueda de metabolitos secundarios en los microorganismos.

Por muchos años se han utilizado métodos de cultivo en donde se ha logrado cultivar a especies bacterianas, creando poblaciones densas que facilitan la obtención de extractos bacterianos, que pueden ser examinados con base en sus propiedades bioactivas.

Técnicas de diversidad microbiana dependientes de cultivo

Para llegar a conocer los compuestos químicos producidos por las bacterias extraídas de diferentes muestras ambientales, es necesario su cultivo y aislamiento para producir extractos bacterianos que puedan ser evaluados química y biológicamente. Las técnicas usadas generalmente se conocen como técnicas de diversidad microbiana dependientes de cultivo o métodos tradicionales de cultivo (Madigan et al., 2005). Estas técnicas se basan en la necesidad que tienen los microorganismos en tomar del ambiente una serie de compuestos que se emplean como fuente de energía y sintetizar los constituyentes celulares necesarios para su supervivencia. Estos compuestos son los nutrientes, los cuales deben contener agua, C, N, S, P, Ca, K, Na, Mg, Mo, Cu y Zn. Algunos microorganismos requieren tomar la energía de la luz u

oxidar compuestos químicos, otros necesitan obtener su fuente de carbono del CO_2 o a través de compuestos orgánicos carbonados. Algunos microorganismos requieren de una fuente de nitrógeno, para lo cual fijan el nitrógeno atmosférico, o lo toman en forma de NH_4^+ . Otros son capaces de reducir NO_3 o NO_2 para emplearlo como fuente de amonio o bien, utilizar aminoácidos como fuente de nitrógeno. Todas estas características, sumando la temperatura, el pH y la salinidad, han demostrado ser de gran utilidad para crear ambientes propicios, para el aislamiento y purificación de microorganismos provenientes de muestras ambientales (Madigan et al., 2005).

Por lo tanto, las muestras ambientales colectadas, son expuestas a diferentes condiciones y medios de cultivo, obteniendo microorganismos capaces de adaptarse a las condiciones establecidas, permitiendo el estudio de la diversidad de microorganismos presentes, cultivables en las diferentes muestras ambientales.

Por todo lo anterior, el objetivo de este trabajo es determinar si existe actividad antibacteriana y anticancerígena en extractos orgánicos de algas marinas de la Bahía de Todos Santos, B.C., y de sus bacterias asociadas debido a la presencia de metabolitos secundarios y determinar la diversidad de bacterias cultivables presentes en la superficie de las algas marinas seleccionadas.

Estos resultados son la base para la realización de estudios posteriores en la elucidación de los compuestos bioactivos presentes en estos organismos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar actividad antibacteriana y anticancerígena en extractos orgánicos de algas marinas de la Bahía Todos Santos, B.C., y sus bacterias asociadas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Aislar e identificar las bacterias presentes en la superficie de las algas marinas *Egregia menziesii*, *Codium fragile*, *Sargassum muticum*, *Endarachne binghamiae*, *Centroceras clavulatum* y *Laurencia pacifica*.
- Determinar actividad antibacteriana en los extractos orgánicos de las algas y las bacterias asociadas.
- Determinar actividad anticancerígena en los extractos orgánicos de las algas y las bacterias asociadas.
- Evaluar la diversidad de bacterias cultivables asociadas a la superficie de las algas marinas *Egregia menziesii*, *Codium fragile*, *Sargassum muticum*, *Endarachne binghamiae*, *Centroceras clavulatum* y *Laurencia pacifica*.

HIPOTESIS

- Los extractos orgánicos de las algas marinas *Egregia menziesii*, *Codium fragile*, *Sargassum muticum*, *Endarachne binghamiae*, *Centroceras clavulatum* y *Laurencia pacifica* y de sus bacterias asociadas, poseen actividad antibacteriana y anticancerígena.

MATERIALES Y MÉTODOS

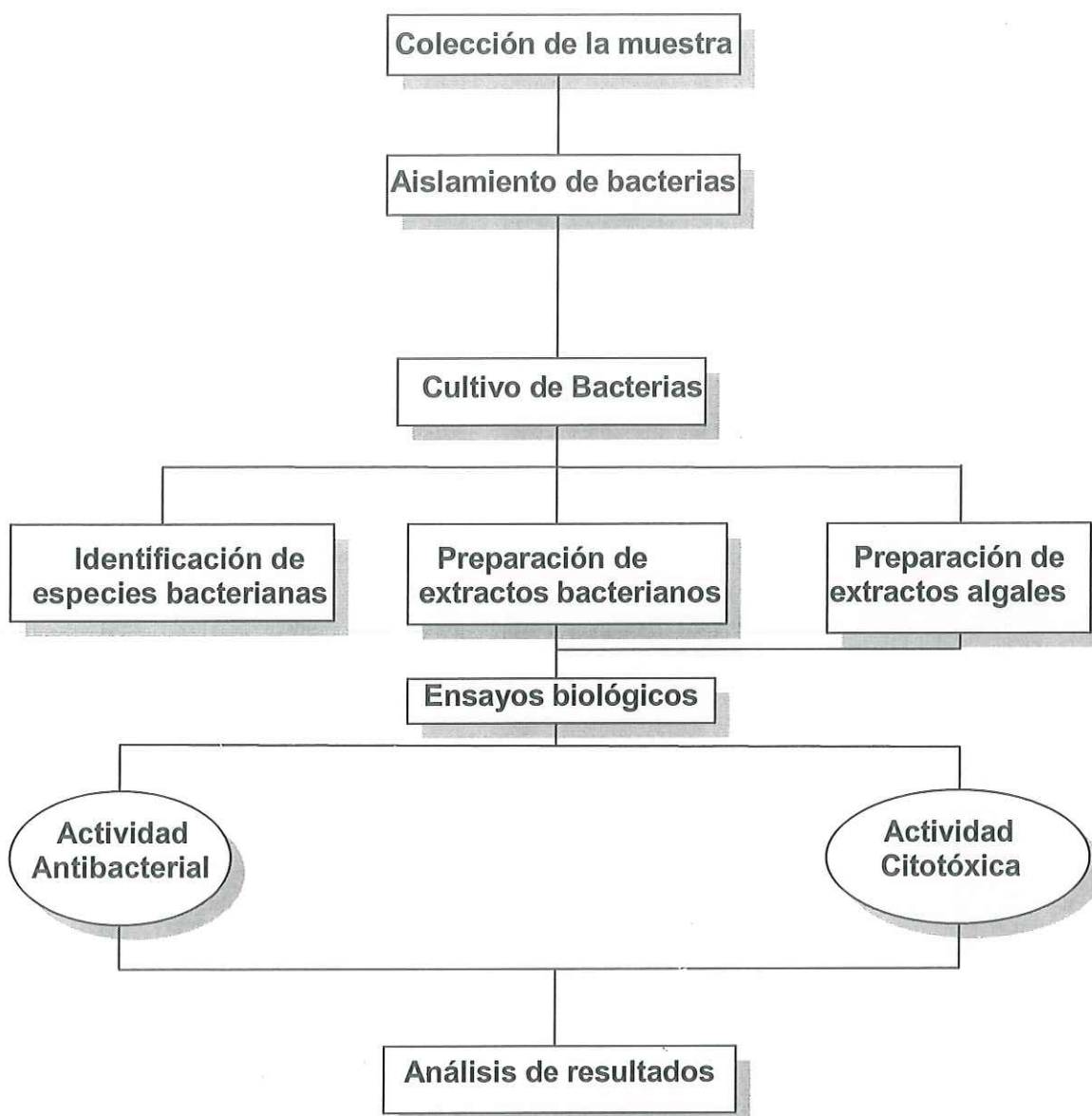


Figura 1. Diagrama de flujo de la metodología seguida.

Colección de Muestras

Las algas: *Egregia menziesii*, *Codium fragile*, *Sargassum muticum*, *Endarachne binghamiae*, *Centrocera clavulatum* y *Laurencia pacifica* se colectaron a mano, en marea baja, en la zona costera de la UABC ($31^{\circ} 51'$ de latitud Norte y $116^{\circ} 40'$ de longitud Oeste).

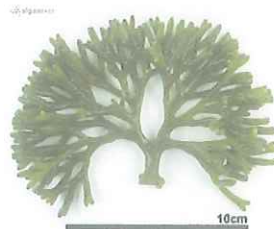


Figura 2. Zona de colección de las muestras.

Las algas colectadas (100 gr) se colocaron en bolsa Ziplock sobre hielo y se transportaron inmediatamente al Laboratorio de Química Marina de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC. Inmediatamente en el laboratorio, se enjuagó la superficie de cada ejemplar con agua potable. Los lavados se colocaron en frascos de boca ancha estériles, para su manejo.



a)



b)



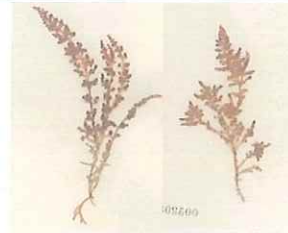
c)



d)



e)



f)

Figura 3. Algas colectadas en la zona costera de la UABC: a) *Egregia menziesii* (Phaeophyta); b) *Codium fragile* (Chlorophyta); c) *Sargassum muticum* (Phaeophyta); d) *Enderachne binghamiae* (Phaeophyta); e) *Centrocera clavulatum* (Rhodophyta); f) *Laurencia pacifica* (Rhodophyta).

Aislamiento de las cepas bacterianas

Después de la colección de las 6 especies de algas se tomó una pequeña cantidad de muestra proveniente del matraz que contiene los lavados del alga con la ayuda de un hisopo estéril y se inoculó en agar marino y caldo marino (Difco), se incubaron durante un período de 24 a 48 horas a 25 °C, hasta observar colonias desarrolladas. Después las bacterias fueron purificadas hasta la tercera generación y finalmente se tomó una de las colonias de cada cepa purificada para ser almacenadas por triplicado en glicerol al 15 % en un criocongelador a -70 °C.

Morfología macroscópica y tinción de Gram

Se tomó una colonia aislada de cada una de las cepas bacterianas obtenidas, las cuales fueron teñidas mediante la reacción de Gram (Gram, 1884), y se observó la coloración de las colonias mediante inspección visual en un microscopio estereoscópico.

Purificación de ADN total

Las cepas bacterianas puras fueron cultivadas en caldo marino a 25 °C, hasta obtener una suspensión celular densa, se tomaron 3 mL de la suspensión y se extrajo el ADN genómico total de cada cepa. El ADN genómico fue extraído usando el kit de de extracción de ADN "DNeasy® Blood and Tissue Kit" cat. No. 69506, de acuerdo con el protocolo del fabricante (Qiagen Corp. Ca. USA).

Determinación de la concentración de ADN total

La concentración de ADN se obtuvo con la ayuda de un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000, obteniendo lectura en un campo de 280 nm, utilizando el buffer AE que se empleó para eluir el ADN como blanco, con 1 µl por muestra. Las muestras de ADN se congelaron a -20 °C.

Amplificación del gen 16S ADN ribosomal

Después de obtener el ADN genómico de las bacterias, se procedió a la amplificación del gen 16S ADN ribosomal, mediante la técnica del PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Se utilizó 0.5 µl de ADN, para la reacción. Para los cebadores UBint Forward 5'-GGTGGAGCATGTGGTTTA-3' y UBint Reverse 5'-CCATTGTAGCACGTGTGT-3' (Sauera, 2005), se utilizó el siguiente programa en el termociclador: 5 min a 94 °C, 1 min a 94 °C, 1 min a 56 °C, 1 min a 72 °C por 30 ciclos, 1 min a 72 °C y por último 10 min a 4 °C, para los cebadores 27 F universal 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' (Galkiewicz, 2008) y para el 1387 R universal 5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC-3' (Marchesi, 1998), se utilizó el siguiente programa: 5 min a 95 °C, 1 min a 94 °C, 1 min a 63 °C, 1min a 72 °C por 35 ciclos, 7 min a 72 °C y por último 10 min a 4 °C.

Secuenciación

Los productos de PCR purificados que contenían la secuencia amplificada del gen 16 ARNr de las cepas bacterianas fueron secuenciados comercialmente (Rebecca and John Moore Cancer Center Sequencing Facilities) usando el cebador universal 27 F.

Análisis filogenéticos

Las secuencias fueron analizadas usando la base de datos BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) función contenida de la base de datos del GeneBank (Altschul et al., 1990).

Las secuencias fueron alineadas usando el programa ClustalX (Staley y Ta, 1985) y éstas fueron importadas dentro del programa Bioedit (Hall y Brown, 2001) con una alineación manual. El árbol filogenético fue construido con las siguientes indicaciones: Bootstrap test of phylogeny (1000 repeticiones), p-distance neighbor joining, usando el programa MEGA4 (Tamura et al., 2007), utilizando un segmento de 623 pares de bases.

Curvas de crecimiento y preparación de extractos crudos bacterianos

Las cepas bacterianas puras almacenadas en glicerol, fueron seleccionadas de una en una, para su crecimiento. A los cultivos se les hizo curvas de crecimiento para determinar el tiempo que tardan en llegar a la fase exponencial, la cual es la fase donde las células tienen una mayor producción de compuestos, incubándolas en baño maría 250 rpm a 30 °C. Los cultivos se

dejaron crecer de 2 a 4 días aproximadamente hasta llegar a la fase exponencial de cada cepa. Al transcurrir este tiempo, se adicionó 2 g de la resina amberlita XAD7 por cada 100 mL de cultivo. Los cultivos se dejaron en presencia de la resina por dos horas para absorber todos los compuestos orgánicos presentes en las células y el medio de cultivo, posteriormente se filtraron a través de gasa y finalmente, a través de papel filtro whatman grado 802 de 12.5 cm de diámetro. Los sólidos obtenidos en los filtros, los cuales contenían la resina con las células bacterianas, se extrajeron exhaustivamente con acetona utilizando 20 mL de acetona por cada 2.5 g de resina. Finalmente, el extracto crudo con acetona fue concentrado mediante destilación a presión reducida (rotaevaporador marca Buchi modelo 461 con una bomba de vacío Vacuubrand modelo CVC2). Las muestras se pesaron y se redisolviéron en metanol.

Preparación de extractos algales

Las algas recolectadas se enjuagaron inmediatamente con agua potable y se introdujeron en frascos de boca ancha conteniendo una mezcla de metanol: diclorometano (7:3), de tal manera que todo el material quedó cubierto por la mezcla de disolventes. Las algas sumergidas en la solución se almacenaron por 2 semanas. Posteriormente, cada extracto fue filtrado y concentrado mediante destilación a presión reducida (rotaevaporador marca Buchi modelo 461 con una bomba de vacío Vacuubrand modelo CVC2). Las muestras se pesaron y se redisolviéron en metanol.

Ensayos Biológicos

Actividad citotóxica

Los extractos de algas y bacterias fueron probados contra células de cáncer colorectal HCT116 a una concentración de 10 mg mL^{-1} en sulfóxido de dimetilo (DMSO), y se obtuvo la concentración mínima inhibitoria media (IC_{50}) en $\mu\text{g mL}^{-1}$, empleando un método de dilución y después de 72 horas de incubación se leyó su absorbancia a 490 nm, utilizando como control negativo DMSO y como control positivo etopósido a la misma concentración que los compuestos. Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pozos (Figura 4). El ensayo se llevó a cabo en el Laboratorio Kaplan del Centro de Biotecnología Marina y Biomedicina del Instituto de Oceanografía de Scripps, UCSD, San Diego, CA.

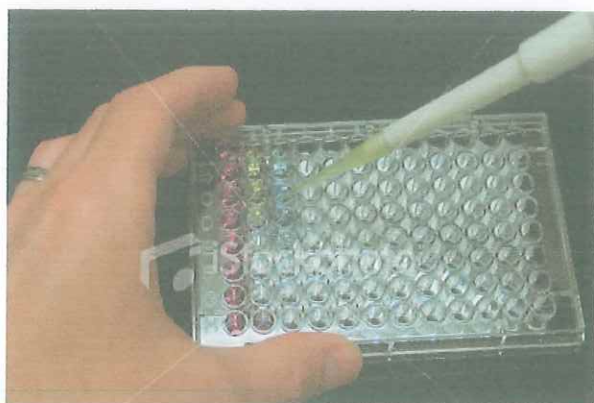


Figura 4. Placa de 96 pozos utilizada para ensayos bioquímicos.

Las placas se leyeron con la ayuda de un lector de placas (*Molecular Devices*), utilizando un programa llamado *Soft*, diseñado para leer el porcentaje

de sobrevivencia celular existente en cada pozo. Considerándose compuesto con actividad anticancerígena aquella cuyo porcentaje de sobrevivencia celular haya sido menor del 50 % a una concentración menor a 10 mg mL^{-1} .

Actividad antibacteriana

Los extractos de algas y bacterias fueron probados contra cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas aeruginosa* (Laboratorio de microbiología, del Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Ensenada, Baja California) a una concentración de 10 mg mL^{-1} en DMSO. Se obtuvo el porcentaje de sobrevivencia celular en $\mu\text{g mL}^{-1}$, empleando un método de dilución y después de 12 horas de incubación a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ se leyó su absorbancia a 600 nm, utilizando como control negativo DMSO y como control positivo vancomicina ($0.195\text{-}0.391 \mu\text{g mL}^{-1}$). Las placas se leyeron en un lector de placas (*Molecular Devices*) a 600 nm en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Finalmente se calculó la MIC del estándar y los compuestos con un factor de dilución (Tabla 5).

Tabla 5. Concentración de los extractos contenida en la placa de 96 pozos después de una dilución 1:10.

Fila	Extracto (10 mg mL⁻¹)	Estándar Mg mL⁻¹
A	250	25
B	125	12.5
C	62.5	6.25
D	31.25	3.125
E	15.625	1.5625
F	7.8	0.78125
G	3.9	0.3906
H	1.95	0.195

Cálculo de la dosis letal media DL₅₀

En términos generales un bioensayo puede ser definido como cualquier prueba que involucra organismos vivos, a su vez, se puede señalar como cualquier método por medio del cual, alguna propiedad de una sustancia o material, es medida en términos de la respuesta biológica que produce. El principal objetivo de este tipo de análisis es evaluar el nivel de estímulo que es necesario para obtener una respuesta en un grupo de individuos de la población. El nivel de estímulo que causa una respuesta en el 50% de los individuos de una población bajo estudio es un importante parámetro de caracterización denotado como dosis letal media

(DL₅₀). El período de tiempo durante el cual se expone el estímulo, debe ser especificado, por ejemplo, 24 horas DL₅₀, esto con el fin de comparar y estimar la potencia relativa del estímulo. Para la determinación de la DL₅₀ el primer paso es la obtención del % de sobrevivencia celular por cada extracto y cada blanco, se corrigen las mortalidades mediante la fórmula de Abbott. La fórmula es la siguiente:

$$M = \frac{m_e - m_b}{1 - m_b} \quad (\text{Fórmula de Abbott})$$

Dónde:

M = Mortalidad:

m_e = Densidad óptica en el extracto.

m_b = Densidad óptica en el blanco.

Ya corregidas las mortalidades, los datos obtenidos son introducidos al software "BioStat 2008" (<http://www.analystsoft.com>) utilizando el análisis Probit para obtener los valores de DL₅₀.

RESULTADOS

Identificación de cepas bacterianas

En total se recolectaron 6 especies de algas marinas (*Egregia menziesii*, *Codium fragile*, *Sargassum muticum*, *Endarachne binghamiae*, *Centroceras clavulatum* y *Laurencia pacifica*), de las cuales se seleccionaron 35 cepas de bacterias para el análisis. Las algas fueron identificadas por el Oceanólogo Raúl Aguilar Rosas, bajo inspección visual.

Tabla 6. Cepas bacterianas seleccionadas de las 6 diferentes algas marinas.

Alga Marina	Cepa*
<i>Egregia menziesii</i>	Em11, Em12, Em14, Em15, Em16
<i>Sargassum muticum</i>	Sm32, Sm34, Sm35, Sm36, Sm37
<i>Centroceras clavulatum</i>	Cc51, Cc52, Cc53, Cc54, Cc55, Cc56, Cc57
<i>Codium fragile</i>	Cf21, Cf22, Cf23, Cf24, Cf25, Cf26
<i>Endarachne binghamiae</i>	Eb41, Eb42, Eb43, Eb44, Eb45, Eb46, Eb47
<i>Laurencia pacifica</i>	Lp62, Lp63, Lp64, Lp65, Lp66

* Las cepas se nombraron de acuerdo a la especie de la que provenían escribiendo una letra mayúscula para el género y una letra minúscula para la especie, consecutivamente, las cepas bacterianas fueron nombradas de acuerdo a la especie del alga del cual fueron aisladas, con un número consecutivo que representa el número de alga y que van de 1 al 6, seguidos por otro número que significa el número de bacteria aislada de esa alga y que van del 1 al 7, por ejemplo: Cc55 significa *Centroceras clavulatum*, número de alga 5, bacteria 5.

Morfología macroscópica

De las 35 cepas colectadas en este estudio, 16 son Gram positivas y 19 son Gram negativas (Tablas 7 y 8). Por otra parte, entre los colores de colonias predominantes entre las cepas fueron el crema cristalino y el amarillo, presentando la mayoría de las colonias halos más tenues alrededor de cada colonia, como se muestra en la tabla 8.

Tabla 7. Tinción de Gram de bacterias extraídas de las algas marinas.

Alga marina	Gram (+)	Gram (-)
<i>Egregia menziesii</i>	3	2
<i>Sargassum muticum</i>	3	2
<i>Centroceras clavulatum</i>	3	4
<i>Codium fragile</i>	3	3
<i>Endarachne binghamiae</i>	3	4
<i>Laurencia pacifica</i>	1	4

Tabla 8. Morfología macroscópica de las 35 cepas bacterianas seleccionadas de la superficie de 6 algas marinas observadas en cajas de petri conteniendo agar marino, como medio de nutrientes.

Alga marina	Cepa*	Tinción Gram	Color
<i>Egregia menziesii</i>	Em11	+	Amarillo intenso
	Em12	+	Crema intenso con halo tenue
	Em14	+	Crema rosado intenso
	Em15	-	Crema cristalino con halo
	Em16	-	Amarillo intenso
	<i>Codium fragile</i>	Cf21	+
Cf22		-	Crema cristalina
Cf23		+	Amarillo intenso con halo intenso
Cf24		-	Amarrillo
Cf25		-	Amarillo halo más claro
Cf26		+	Crema
<i>Sargassum muticum</i>		Sm32	+
	Sm34	+	Amarillo intenso
	Sm35	-	Amarillo intenso
	Sm36	+	Rosado
	Sm37	-	Amarillo
<i>Endarachne binghamiae</i>	Eb41	+	Crema intenso con halo cristalino
	Eb42	+	Amarillo
	Eb43	-	Crema claro
	Eb44	-	Amarillo
	Eb45	+	Rosado claro
	Eb46	-	Crema cristalino
	Eb47	-	Crema
	<i>Centroceras clavulatum</i>	Cc51	-
Cc52		+	Crema
Cc53		-	Amarillo difuso
Cc54		+	Crema con halo
Cc55		-	Crema con halo
Cc56		+	Amarillo
Cc57		-	Crema-amarillento
<i>Laurencia pacifica</i>	Lp62	-	Amarilla intensa
	Lp63	+	Crema cristalino
	Lp64	-	Crema con halo
	Lp65	-	Amarillo
	Lp66	-	Cristalina

Diversidad bacteriana presente en macroalgas marinas

La tabla 9 muestra la relación de los vecinos filogenéticos más cercanos encontrados, después de haber comparado las secuencias de las cepas obtenidas mediante el uso de la técnica 16S ARNr con la base de datos del GeneBank. Con las comparaciones realizadas se encontró una predominancia de tres grupos principales de bacterias: *Firmicutes*, *Proteobacterias* y *Actinobacterias*, la mayoría de los integrantes de estos grupos han sido reportados en ambientes marinos, según Zobell y Upham (1944).

Tabla 9. Identidad de secuencias más cercanas a las bacterias aisladas, después de la comparación de secuencias con el BLAST de NCBI.

Cepa	Vecino filogenético más cercano	% Identidad	Fuente	No. de Acceso
Em11	<i>Leucobacter sp.</i>	99.84	Cultivo axénico	DQ644493
Em12	<i>Staphylococcus sp.</i>	98.56	Huevo de pescado	AJ936959
Em14	<i>Micrococcus sp.</i>	84.04	Tanque de criadero de larvas	FJ015039
Em15	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	99.79	Biofilme	FJ195007
Em16	<i>Brevibacterium casei</i>	99.4	Cepa de colección	AJ251418
Cf21	<i>Brevibacterium sp.</i>	94.83	Suelo de desierto	EU333894
Cf22	<i>Brachybacterium sp.</i>	100	Mar	EF155543
Cf23	<i>Bacillus pumilus</i>	100	Planta	EU447665
Cf24	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	99.43	Agua de mar Ártico	EU365603
Cf25	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	93.86	Cabina de aire	EU379290
Cf26	<i>Bacillus sp.</i>	96.49	Suelo	FJ214375
Sm32	<i>Kocuria palustris</i>	100	Cabina de aire	EU379293
Sm34	<i>Bacillus altitudinis</i>	93.41	Planta	FJ174641
Sm35	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	98.93	Agua de mar Ártico	EU365603
Sm36	<i>Bacillus sp.</i>	99.87	Ambiente	AF227852
Sm37	<i>Vibrio sp.</i>	97.17	Biofilme	EU394443
Eb41	<i>Bacillus pumilus</i>	97.76	Leche	AY294325
Eb42	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	98.81	Tubérculo	AF532917
Eb43	<i>Brachybacterium sp.</i>	100	Espécimen clínico	EU086801
Eb44	<i>Eutintinnus pectinis</i> clone	83.14	Cepa de colección	AF399170
Eb45	<i>Bacillus pumilus</i>	100	Planta	EU447665
Eb46	<i>Microbulbifer thermotolerans</i>	98.03	Sedimento marino	AB304802
Eb47	<i>Alcaligenes sp.</i>	98.21	Calyptra thalictri (gusano)	EF599757
Cc51	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	79.02	Agua de mar Ártico	EF639366
Cc52	<i>Bacillus pumilus</i>	98.65	Leche	AY294325
CC53	<i>Vibrio sp.</i>	98.54	Biofilme	EU394443
Cc54	<i>Microbulbifer thermotolerans</i>	100	Sedimento marino	AB304802
Cc55	<i>Tenacibaculum sp.</i>	100	Espécimen marino	AB265189
Cc56	<i>Bacillus sp.</i>	91	Sedimento marino	FJ170026
Cc57	<i>Pseudomona sp.</i>	100	Suelo	EU440785
Lp62	<i>Pseudomona stutzeri</i>	99.63	Lodo	AJ310484
Lp63	<i>Bacillus sp.</i>	100	Suelo	EU417659
Lp65	<i>Alteromonas sp.</i>	99.85	Sedimento marino	EU016171

En la figura 5, se encuentra el árbol filogenético construido con base en las secuencias del gen 16S ARNr de las cepas aisladas y los vecinos filogenéticos más cercanos, otorgados por la base de datos del GeneBank. El árbol muestra tres grupos de bacterias que predominan al parecer en la superficie de las 6 algas marinas colectadas y se resaltan en color rojo.

El árbol puede subdividirse también en Gram positivas y Gram negativas. En este aspecto, no existe una relación entre algún determinado tipo de alga y un cierto tipo de bacterias, como se muestra en la figura 5, todas las cepas pertenecientes a cada grupo de bacteria, están distribuidas de manera uniforme, sin existir ningún patrón lógico que se pueda discutir.

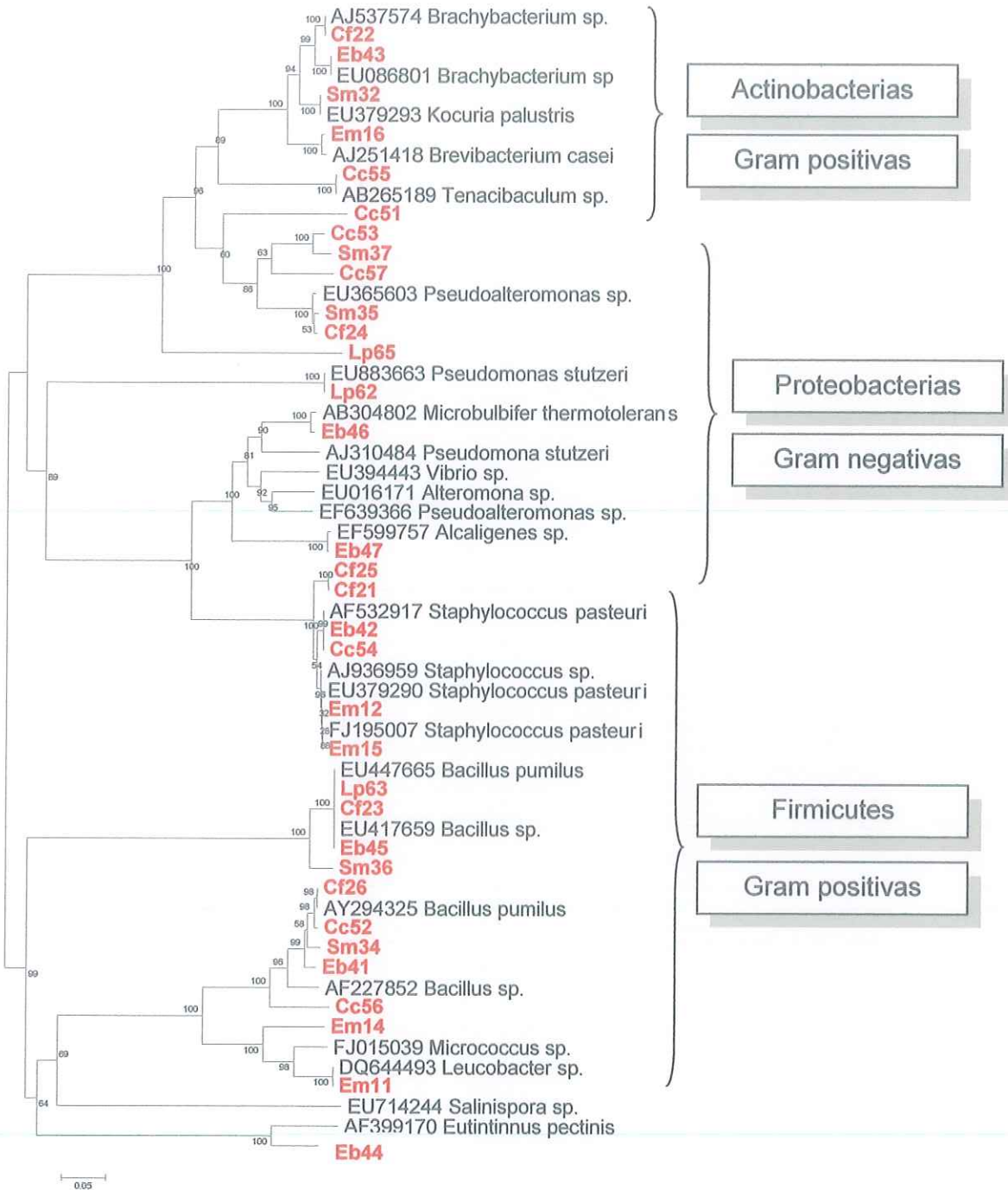


Figura 5. Relación evolutiva de 58 taxa con clonas secuenciados utilizando cebadores universales de Bacterias 27F y 1387R en muestras marinas. La historia evolutiva fue evaluada usando el método de "Neighbor-Joining" (Rusch et al., 1987). Con un total de 625 bases nucleotídicas, el análisis filogenético fue producido por MEGA4 (Tamura et al., 2007).

Ensayos biológicos

Entre los resultados obtenidos después de haber realizado los ensayos biológicos de las 35 cepas de bacterias y los extractos de las 6 algas marinas, se encontró: que las cepas Em16, Cc53 y Cc55 aisladas de las algas *Egregia menziesii* y *Centroceras clavulatum* mostraron una baja actividad contra células de cáncer colorectal (HCT-116) con 58, 101.662 y 56.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. La cepa Cc51 aislada del alga *Centroceras clavulatum* mostró actividad citotóxica con un IC_{50} de 6.492 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La cepa Sm36 aislada del alga *Sargassum muticum* mostró una actividad de 5.531 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mientras que la cepa Eb46 aislada del alga *Enderachne binghamiae* mostró la mayor actividad anticancerígena dando un IC_{50} de 2.843 $\mu\text{g mL}^{-1}$ cuando se evalúan a una concentración de 10 mg mL^{-1} en DMSO (Tabla 10).

Tabla 10. Resultados de los ensayos biológicos realizados en: *Centro de Biotecnología Marina y Biomedicina del Instituto Oceanográfico de Scripps, UCSD. San Diego, California. ** Ensayos realizados en el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), a una concentración de 10 mg mL⁻¹ en sulfóxido de dimetilo. Nsa: representa actividad no significativa.

	*HCT116 Cáncer colorectal	*MRSA <i>Staphylococcus aureus</i>	** <i>Klebsiella pneumoniae</i>	** <i>Proteus mirabilis</i>	** <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Algas y cepas	IC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	MIC (µg mL ⁻¹)	MIC (µg mL ⁻¹)	MIC (µg mL ⁻¹)	MIC (µg mL ⁻¹)
<i>Egregia menziesii</i>	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa
11	Nsa	Nsa	211.54	Nsa	Nsa
12	Nsa	Nsa	Nsa	212.35	Nsa
14	Nsa	Nsa	203.07	Nsa	Nsa
15	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa
16	58	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa
<i>Codium fragile</i>	Nsa	Nsa	Nsa	140.10	Nsa
21	Nsa	Nsa	Nsa	196	Nsa
22	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa
23	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa
24	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa
25	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa
26	Nsa	Nsa	Nsa	213.9	Nsa
<i>Sargassum muticum</i>	Nsa	Nsa	Nsa	140.10	Nsa
32	Nsa	Nsa	Nsa	165.76	Nsa
34	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa
35	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa
36	5.531	Nsa	Nsa	174.09	Nsa
37	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa
<i>Endarachne binghamiae</i>	Nsa	Nsa	Nsa	178.57	Nsa
41	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa
42	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa
43	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa
44	Nsa	Nsa	Nsa	188.11	Nsa
45	Nsa	Nsa	Nsa	209.78	Nsa
46	2.843	Nsa	Nsa	176.94	Nsa
47	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa
<i>Centroceras clavulatum</i>	Nsa	Nsa	Nsa	181.92	Nsa
51	6.492	Nsa	Nsa	180.55	Nsa
52	Nsa	Nsa	Nsa	217.16	Nsa
53	101.662	Nsa	Nsa	153.19	Nsa
54	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa
55	56.7	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa
56	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa
57	Nsa	Nsa	Nsa	159.12	Nsa
<i>Laurencia pacifica</i>	Nsa	Nsa	Nsa	107.18	Nsa
62	Nsa	Nsa	Nsa	185.49	Nsa
63	Nsa	Nsa	Nsa	288.11	Nsa
64	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa
65	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa
66	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa	Nsa

Los bioensayos para evaluar la actividad antibiótica en contra de las bacterias patógenas humanas: *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas aeruginosa*, fueron realizados por métodos de dilución en microplacas de 96 pozos, dando como resultado, una bioactividad baja en 14 cepas bacterianas aisladas de las 6 diferentes macroalgas marinas y 5 de las algas a excepción de *Endarachne binghamiae* en contra de la cepa *Proteus mirabilis*.

A los extractos de las algas y bacterias marinas no se les encontró actividad antibiótica contra las cepas *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las cepas Em12, Cf21, Cf26, Sm32, Sm36, Eb44, Eb45, Eb46, Cc51, Cc52, Cc53, Cc57, Lp62 y Lp63 tuvieron una baja actividad en contra de *Proteus mirabilis*, sin embargo, disminuyeron el crecimiento bacteriano mayor al 50 % con LD₅₀ de 212.35, 196, 213.90, 165.76, 174.09, 188.11, 209.78, 178.94, 180.55, 217.16, 153.39, 159.12, 185.49 y 288.11 µg mL⁻¹, respectivamente y las algas marinas Cf, Sm, Eb, Cc, Lp con LD₅₀ de 140.10, 140.10, 178.57, 181.92 y 107.18 µg mL⁻¹, respectivamente. Para la bacteria *Klebsiella pneumoniae*, las cepas Em11 y Em14 mostraron actividad con 211.54 y 203.07 µg mL⁻¹, respectivamente.

DISCUSIÓN

Los productos naturales siguen siendo un recurso muy importante para la elaboración de fármacos. Un gran número de plantas, microbios y recursos marinos han sido examinados en la búsqueda de compuestos bioactivos. Se considera importante que esta búsqueda de nuevos metabolitos secundarios se enfoque a microorganismos endófitos aislados de plantas (Firakova et al., 2007).

Los microorganismos endófitos son entidades microbianas que ocupan el tejido de plantas, éstos incluyen todos los microorganismos que colonizan asintóticamente el tejido interno vivo de sus huéspedes. Por ejemplo, algunos hongos pueden crecer con la planta en una relación de mutualismo, los beneficios de esta relación es que el hongo le provee energía y nutrientes, y su presencia se manifiesta con la mejora en el crecimiento y sobrevivencia de la planta huésped, mientras que la planta la sirve al hongo como sustrato para desarrollarse (Firakova et al., 2007).

La pregunta es, si las sustancias químicas bioactivas de plantas medicinales son producidas por la planta o, como consecuencia de una relación mutualista.

Parece claro que existe una relación de especificidad entre el huésped y algunos microorganismos, tal especificidad implica interacciones bioquímicas complejas entre la planta y el microorganismo asociado. La información existente puede proveer la dirección para seleccionar el tipo de organismos

asociados a plantas medicinales para la búsqueda de nuevos productos naturales (Strobel, 2003).

Ciertos microorganismos asociados a plantas producen enzimas necesarias para la colonización. A su vez, se ha demostrado que la mayoría de estos microorganismos son capaces de utilizar, (al menos in vitro) los componentes celulares de la planta. En los microorganismos endófitos por ejemplo, se sabe que utilizan xylano y pectina, mostrando lipoficidad y produciendo peroxidasas no específicas y lacasas (Sieber et al., 1991; Leuchtmann et al., 1992).

Morfología macroscópica

Se realizó la tinción de Gram a las cepas obtenidas, después de haber sido aisladas y purificadas hasta la tercera generación de colonias puras. De las 35 cepas seleccionadas en este estudio, 16 son Gram positivas y 19 son Gram negativas. Estudios realizados previamente con bacterioplanton demostraron que la mayoría de las bacterias marinas son Gram negativas, sin embargo, en estudios recientes con sedimentos marinos se ha encontrado evidencia de que la mayoría de las bacterias que conforman la comunidad bacteriana en sedimentos marinos parecen ser Gram positivas (Gontang et al., 2007).

En las cepas aisladas de la superficie del alga *Laurencia pacifica* se observó una tendencia hacia bacterias Gram negativas, en las algas restantes no hubo ninguna tendencia entre Gram positivas y negativas. Esta tendencia

encontrada en la tinción de Gram es interesante, ya que entre estos dos tipos de bacterias existen diferencias en estructura y composición química.

Por ejemplo, las bacterias Gram positivas presentan una membrana citoplasmática, tienen una capa gruesa de peptidoglucano, contienen ácidos teicoicos y lipoteicoicos, que sirven como agentes quelantes y en cierto tipo de adherencias; las bacterias que representan este tipo de bacterias son los *Firmicutes* y *Actinobacterias*, que incluye muchos géneros bien conocidos tales como *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, y *Clostridium*.

Por otra parte, las bacterias Gram negativas contienen una pared celular delgada de peptidoglucano y una membrana externa que recubre la pared celular de estas bacterias. La membrana externa contiene diversas proteínas, como porinas o canales proteicos que permiten el paso de ciertas sustancias. También presentan una estructura de lipopolisacáridos (LPS). Las bacterias que predominan en este grupo son las *Proteobacterias*, incluyendo a *Escherichia coli*, *Salmonella* y otras *enterobacterias*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Helicobacter*, *Stenotrophomonas*, *Bdellovibrio*, bacterias del ácido acético, *Legionella* y las *proteobacterias alfa* como *Wolbachia* y muchas otras. (Madigan et al., 2005).

Todos los compuestos producidos por estas bacterias pueden interactuar con el ambiente producido por las diferentes algas seleccionadas en este estudio, es por eso que se logran observar estas tendencias.

En los estudios realizados por Gallardo et al., (2004), encontraron una predominancia de bacterias Gram negativas pertenecientes a los géneros: *Vibrio* (20%), *E. coli* inactiva (18%), *Flavobacterium* (11%), *Flexibacter* (9%), *Moraxella* (9%), *Pseudomonas* (9%), *Aeromonas* (2%), *Acinetobacter* (2%), *Cotophaga* (2%), *Photobacterium* (2%) y *Alteromonas* (2%). Las bacterias Gram positivas que se encontraron fueron *Staphylococcus* y se encontraron presentes en el alga marina *Monostroma undulatum*.

Diversidad bacteriana cultivable presente en macroalgas marinas

De las 35 cepas bacterianas seleccionadas de las 6 diferentes algas marinas, se logró apreciar una predominancia de tres familias de bacterias: *Firmicutes*, *Proteobacterias* y *Actinobacterias* (estas últimas son consideradas como excelentes productoras de metabolitos secundarios).

En total se identificaron 15 especies de bacterias distribuidas sin ninguna tendencia en las diferentes algas. Sin embargo, se logró observar bacterias que crecieron exclusivamente en algunas de las algas, como por ejemplo, *Leucobacter sp.*, sólo estuvo presente en el alga *Egregia menziessi*, esta bacteria miembro de la familia de las *Actinobacterias*, se ha encontrado asociada también al nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Muir y Tan, 2008).

Otra de las cepas se encontró asociada únicamente a *Egregia menziessi*, identificada como *Micrococcus*, usualmente encontrada en suelo y agua, este miembro perteneciente al género de *Actinobacterias*, es catabólicamente versátil, con la habilidad de utilizar un extenso rango de

substratos inusuales, tales como piridina, herbicidas, bifenilos policlorados y petróleo, puede también realizar la biodegradación de muchos contaminantes ambientales (Zhuang et al., 2003).

La cepa Sm32, identificada como *Kocuria palustris*, presentó exclusividad con el alga *Sargassum muticum*, esta alga es considerada una especie invasiva en muchos países, a pesar de esto, la especie de bacteria encontrada sobre ella (*Kocuria*) tiene aplicaciones industriales como degradadora de materia orgánica (Kovacs et al., 1999).

Los *Alcaligenes* encontrados exclusivamente en el alga *Endarachne binghamiae*, son usadas para la producción industrial de aminoácidos no estándares (Madigan et al., 2005).

La cepa relacionada a *Tenacibaculum* encontrada solamente en el alga *Centroceras clavulatum*, se ha encontrado asociada a esponjas y algas marinas productoras de metabolitos secundarios en las Islas Palau (Susuki et al., 2001).

Por último, la cepa bacteriana miembro del género *Alteromona*, se encontró asociada solamente al alga *Laurencia pacifica*, aisladas por lo general en agua de mar. Estas *Proteobacterias* tienen uso industrial, ya que producen polisacáridos de alto peso molecular. Todas estas anotaciones son importantes mencionarlas, ya que varias de las cepas bacterianas filogenéticamente cercanas a las encontradas, son aplicadas en la industria actualmente, por lo tanto, es necesario estudiar las interacciones químicas alga-bacteria para entender mejor el proceso de producción de los diferentes metabolitos secundarios, que éstas especies producen, por lo cual, aunque este trabajo

está enfocado en la búsqueda de compuestos antibacterianos y anticancerígenos, los resultados obtenidos pueden tener aplicaciones industriales.

Tabla 11. Especies bacterianas asociadas a la superficie de las 6 algas marinas seleccionadas en este estudio.

Bacterias	Algas marinas
<i>Leucobacter</i>*	<i>Egrecia menziesii</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>Egrecia menziesii</i> , <i>Codium fragile</i> , <i>Endarachne binghamiae</i>
<i>Micrococcus</i>*	<i>Egrecia menziesii</i>
<i>Brevibacterium</i>	<i>Egrecia menziesii</i> , <i>Codium fragile</i>
<i>Brachy bacterium</i>	<i>Codium fragile</i> , <i>Endarachne binghamiae</i>
<i>Bacillus</i> **	<i>Codium fragile</i> , <i>Endarachne binghamiae</i> , <i>Sargassum muticum</i> , <i>Endarachne binghamiae</i> , <i>Centroceras clavulatum</i> , <i>Laurencia pacifica</i>
<i>Kocuria</i>*	<i>Sargassum muticum</i>
<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>Codium fragile</i> , <i>Sargassum muticum</i> , <i>Centroceras clavulatum</i>
<i>Vibrio</i>	<i>Sargassum muticum</i> , <i>Centroceras clavulatum</i>
<i>Eutintinnus</i>	<i>Endarachne binghamiae</i>
<i>Microbulbifer</i>	<i>Endarachne binghamiae</i> , <i>Centroceras clavulatum</i>
<i>Alcaligenes</i>*	<i>Endarachne binghamiae</i>
<i>Tenacibaculum</i>*	<i>Centroceras clavulatum</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Centroceras clavulatum</i> , <i>Laurencia pacifica</i>
<i>Alteromonas</i>*	<i>Laurencia pacifica</i>

* Las especies resaltadas muestran especificidad con una de las algas marinas. **Las especies de *Bacillus* se encontraron en la mayoría de las algas, algunas de ellas son productoras de compuestos antibacterianos y anticancerígenos.

Las especies de *Bacillus* fueron las que proliferaron en todas las algas, con un total de 9 cepas (26 %) del total de las 35 bacterias estudiadas, estas

bacterias se distribuyeron en todas las algas a excepción del alga *Egregia menziesii* (Tabla 11). Por lo general pueden ser encontradas en el suelo, agua de mar y ríos, se ha reportado que *Bacillus brevis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa*, *B. pumilus* y *B. subtilis* son productoras de antibióticos (Madigan et al., 2005).

Actividad anticancerígena

La cepa bacteriana Eb46 con una concentración inhibitoria media de $2.843 \mu\text{g mL}^{-1}$, tuvo un porcentaje de similitud de 98.03 con *Microbulbifer thermotolerans*, y la cepa Cc51 con una IC_{50} de $6.492 \mu\text{g mL}^{-1}$ tuvo una similitud del 79.02 % con *Pseudoalteromonas sp.* En estudios recientes, a estas dos especies se les encontró formando biopelículas en áreas marinas, descubriendo que este tipo de bacterias de la familia de las proteobacterias producen compuestos químicos para protegerse de otros protozoarios predadores; Un ejemplo de estos compuestos es la violaceína, un alcaloide del cual se ha demostrado que es sintetizado predominantemente en biopelículas, dicho compuesto en concentraciones nanomolares inhiben células protozoicas e inducen muerte celular programada en células eucariontes, tales cepas bacterianas productoras de biopelículas secretan sustancias químicas específicas de defensa que contribuyen a una persistencia exitosa en varios ambientes y proveen un contexto ecológico y evolucionario para el descubrimiento de metabolitos bacterianos dirigidos a células eucariontes (Matz et al., 2008).

La cepa Sm36 que presentó IC₅₀ de 5.531 µg mL⁻¹ tuvo una similitud con *Bacillus sp.*, en un 99.87 %, a pesar de que este tipo de bacteria puede encontrarse casi en cualquier sustrato, se puede sugerir que esta especie al asociarse con la macroalga *Sargassum muticum*, parece haber adquirido la habilidad de sintetizar algún compuesto capaz de inhibir células de cáncer colorectal HCT-116, al encontrarse como simbiote en el alga. Se ha reportado que *Sargassum muticum* presenta baja actividad antibacteriana contra algunas especies de algas marinas (Hellio et al., 2001).

Actividad antibacteriana

Las cepas y algas marinas no mostraron ninguna actividad en contra de las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*. Estos resultados nos indican efectivamente que existen mecanismos de respuesta en contra de ciertos organismos y que estos mecanismos son selectivos, como lo indica Matz et al., (2008), al estudiar las biopelículas marinas, donde observaron una producción de sustancias químicas como la violaceina, que funcionan como respuesta de defensa contra ciertos predadores específicos como los protozoarios consumidores de bacterias, lo que permite una persistencia exitosa de biopelículas de bacterias en varios ambientes marinos. Por esta razón, es posible que las algas seleccionadas en este estudio que fueron colectadas en la misma área de la costa, compartan mecanismos de defensa similar a aquellos, creando un papel ecológico y biotecnológico interesante, en lo que se refiere a la búsqueda de productos naturales marinos.

Finalmente, los resultados de este proyecto nos indican una fuerte similitud entre los organismos recolectados en la misma área, en lo que se refiere a actividad antibiótica en contra de la cepa *Proteus mirabilis*. La cepa *Proteus mirabilis* es la causante de varias enfermedades para el humano, puede causar infecciones en heridas, septicemia y neumonías, también es la causante de los cálculos en los riñones. A pesar de que *Proteus mirabilis* es susceptible a muchos antibióticos como las tetraciclinas, del 10 % – 20 % de las cepas de *Proteus mirabilis* son resistentes a las cefalosporinas y ampicilinas de 1ª generación. Sin embargo, el 40% de las cepas examinadas fueron activas contra esta cepa, sugiriendo que especies bacterianas que comparten un mismo hábitat y un substrato similar como en este caso algas marinas, pueden producir compuestos químicos similares que pudieran actuar como defensa en contra de otros organismos que no pertenecen a ese ambiente en particular, facilitando así la obtención de compuestos químicos bioactivos.

CONCLUSIONES

1. Bacterias de la familia de los *Firmicutes*, las *Proteobacterias* y las *Actinobacterias* se encuentran asociadas a macroalgas marinas de las costas de la Bahía Todos Santos, BC.
2. Las bacterias Eb46, Cc51, Sm36, Em16, Cc53 y Cc55 asociadas a las macroalgas marinas estudiadas, producen compuestos capaces de inhibir el crecimiento de células de cáncer colorectal HCT-116.
3. Las bacterias Em12, Cf21, Cf26, Sm32, Sm36, Eb44, Eb45, Eb46, Cc51, Cc52, Cc53, Cc57, Lp62 y Lp63 asociadas a las macroalgas marinas estudiadas, producen compuestos capaces de inhibir el crecimiento de la bacteria Gram negativa *Proteus mirabilis*.
4. Las bacterias marinas Em11 y Em14 asociadas a las macroalgas marinas estudiadas, producen compuestos capaces de inhibir el crecimiento de la bacteria Gram negativa *Klebsiella pneumoniae*.
5. Los extractos orgánicos de las macroalgas marinas *Codium fragile*, *Sargassum muticum*, *Endarachne binghamiae*, *Centroceras clavulatum* y *Laurencia pacifica* poseen compuestos que inhiben el crecimiento de la bacteria Gram negativa *Proteus mirabilis*.
6. Las algas marinas más abundantes en la Bahía de todos Santos, B.C., estudiadas en este trabajo así como sus bacterias asociadas, representan un potencial de compuestos químicos con actividad

antibacteriana y anticancerígena, que podría ser explotada para la extracción de fármacos.

LITERATURA CITADA

- ALTSCHUL, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and D.J., Lipman, 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215: 403-10.
- STATPLUS, 2008. Probit analysis. Biostat 2008. <http://www.analystsoft.com>.
- ANDERSON, R.J., Wolfe, M.S. and D.J., Faulkner, 1974. *Marine Biology*. 27: 281-285.
- AVENDAÑO-HERRERA, R., Lody, M. y C.E., Riquelme, 2005. Producción de sustancias inhibitorias entre bacterias de biopelículas en substratos marinos. *Revista Biología Marina oceanográfica*. 40 (2).
- BERDY, J., 1989. Bioactive metabolites from microorganisms, *Progress in Microbiology*. Eds. Elsevier: Amsterdam 27: 3-25.
- BERMÚDEZ-HUMARÁN, L.G., Cortes-Pérez, N.G., Lefevre, F., Guimarães, V., Rabot, S., Alcocer-Gonzalez, J.M., Gratadoux, J.J., Rodriguez-Padilla, C., Tamez-Guerra, R.S., Corthier, G., Gruss, A. and P., Langella, 2005. A Novel Mucosal Vaccine Based on Live *Lactococci* Expressing E7 Antigen and IL-12 Induces Systemic and Mucosal Immune Responses and Protects Mice against Human Papillomavirus Type 16-Induced Tumors. *The Journal of Immunology*. 175: 7297-7302.
- BETINA, V., 1983. *The chemistry and biology of antibiotics*. Elsevier. Amsterdam. 4-16.
- BLUNT, J.W., Copp B.R., Munro, M.H.G., Northcote, P.T. and M.R., Prinsep, 2005. Marine natural products. *Natural Products Report*. 22: 15-61.

- BORASO, A.L. y R., Negri, 1997. Presencia de *Sporochnus pedunculatus* (*Sporochnales*, *Phaeophycophyta*) en la costa argentina. *Physis* secciones. 53:124-125.
- BURKHOLDER, P.R., Pfister, R.M. and F.H., Leitz, 1966. Production of a Pyrrole Antibiotic by a Marine Bacterium. *Applied Microbiology*. 14:649-653.
- CASIDA, L.E., 1992. Competitive ability and survival in soil of *Pseudomonas* strain 679-2, a dominant, nonobligate bacterial predator of bacteria. *Applied Environmental Microbial*. 58:32-37.
- DARIAS, J.J., 1998. La Biodiversidad de las algas marinas como fuente de interés farmacológico. Medio Ambiente CANARIAS. Revista de la Consejería de Política Territorial y Medio Ambiente. Revista 9.
- DÍAZ-PIFERRER, M., 1969. Distribution of the marine benthic flora in the Caribbean Sea. *Caribbean Journal of Science* 9(3-4): 151-78.
- ESCALANTE-LOZADA, A., Gosset-Lagarda, G., Martínez-Jiménez A. y F., Bolívar-Zapata, 2004. Diversidad bacteriana del suelo: Métodos de estudio no dependientes de cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas. Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Instituto de Biotecnología. UNAM. *Agrociencia* 38: 583-592.
- FIRAKOVA, S., Sturdikova, M. y M. Muckova, 2007. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. *Biologia*. 62: 251-7.
- FISCHEL, J.L., Lemee, R., Formento, P., Caldani, C., Moll, J.L., Pesando, D., Meinesz, A., Grelier, P. and F., Pietra, 1995. Cell growth- inhibitory Effects of

Caulerpenyne, a Sesquiterpenoid from the Marine Alga *Caulerpa taxifolia*,
Anticancer Research. 15: 2155–2160.

FUJIIHARA, M. and T., Nagumo, 1993. An influence of the structure of alginate on
the chemotactic activity of macrophage and the antitumor activity. Carbohydrate
Research. 243: 211–216.

GALKIEWICZ, J.P. and C.A., Kellogg, 2008. Cross-Kingdom Amplification Using
Bacteria-Specific Primers: Complications for Studies of Coral Microbial Ecology.
Applied and Environmental Microbiology. 74 (24): 7828-7837.

GALLARDO, A., Risso, S., Fajardo, M. and B., Estevao, 2004. Characterization of
microbial population present in the edible seaweed, *Monostroma undulatum*,
Wittrock. Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias Naturales,
Universidad Nacional de Patagonia San Juan Bosco, Comodoro Rivadavia,
Chubut, Argentina. Archivos Latinoamericanos Nutrición. 54(3):337-45.

GLEIBS, S. and D., Mebs, 1999. Distribution and sequestration of palytoxin in coral
reef animals. Toxicon. Elsevier Science, Ireland. 37: 1521-1527.

GONTANG, E.A., Fenical, W. and P.R., Jensen, 2007. Phylogenetic diversity of
gram-positive bacteria cultured from marine sediments. Applied and
environmental microbiology. 73: 3273-82.

GONZÁLEZ, F. y M., Silva, 2001. Biodiversidad química de macroalgas marinas.
Sustentabilidad de la biodiversidad, un problema actual. Bases científico-
técnicas, teorizaciones y proyecciones. Chile. 896.

GRAM, C., 1884. The differential staining of *Schizomycetes* in tissue sections and in
dried preparations. Fortschitte der medicin. 2:185-189.

- HALL, T.A. and J.W., Brown, 2001. The ribonuclease P family. North Carolina State University, Department of Microbiology. *Methods Enzymology*. 341: 56-77.
- HANDELSMAN, J., Liles, M., Mann, D., Riesenfeld, C. and R.M., Goodman, 2002. Cloning the metagenome: culture independent access to the diversity and functions of the uncultivable microbial world. *Methods in Microbiology*, vol. 33. Functional Genomics. Academic Press. Amsterdam. The Netherlands. 241-255.
- HE, H., 2001 Lomaiviticins A and B, potent antitumor antibiotics from *Micromonospora lomaivitiensis*. *Journal of the American Chemical Society*. 123: 5362-5363.
- HELLIO, C., De La Broise, D., Dufossé, L., Le Gal, Y. and N., Bourgougnon, 2001. Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae: potential use for environmentally friendly antifouling paints. *Marine Environmental Research*. 52:2 31-247.
- HIROYUKI, N., Hideomi, A., Koichi, A. and N., Kazutosi, 1990. Antitumor activity of marine algae. *Hydrobiologia*. Laboratory of Marine Biochemistry, Faculty of Bioresources, Mie University, Japan. 204/205: 577-584.
- HODGSON, L.M., 1984. Antimicrobial and antineoplastic activity in some South Florida seaweeds. *Botanic Marine*. 27: 387-390.
- HUANG, R. and H., Lee, 2005. Immunological Properties of the Marine Brown Alga *Enderachne binghamiae* (Phaeophyceae). Institute of Oceanography, National Taiwan University, Taipei, Taiwan *International Journal of Applied Science and Engineering*. 3 (3): 167-173.

- JASTI, S., Sieracki, M.E., Poulton, N., Giewat, M.W. and J.N., Rooney-Varga, 2005. Phylogenetic diversity and specificity of bacteria closely associated with *Alexandrium spp.* and other phytoplankton. *Applied Environmental Microbiology*. 71 (7): 3483-3494.
- KOVACS, G., Burghardt, J., Pradella, S., Schumann, P., Stackebrandt, E. and K., Marialigeti, 1999. *Kocuria palustris sp. nov.* and *Kocuria rhizophila sp. nov.*, isolated from the rhizoplane of the narrow-leaved cattail (*Typha angustifolia*). *International journal of systematic bacteriology*. 49: 167-173.
- LEUCHTMANN, A., Petrini, O., Petrini, L.E. and G.C., Carroll, 1992. Isozyme polymorphism in six endophytic *Phyllosticta* species. *Mycological Research*. 96: 287-294.
- MADIGAN, M., Martinko, J. and J., Parker, 2005. *Brock Biology of Microorganisms*, Decimoprimerá edición, Prentice Hall. Southern Illinois University Carbondale. 1: 102-167.
- MARCHESI, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J. and W.G., Wade, 1998. Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*. 64: 795-799.
- MATZ, C., Webb, J.S., Schupp, P.J., Phang, S.Y., Penesyan, A., Egan, S., Steinberg, P. and S., Kjelleberg, 2008. Marine Biofilm Bacteria Evade Eukaryotic Predation by Targeted Chemical Defense. *School of Biological, Earth and Environmental Sciences and Centre for Marine Bio-Innovation, University of New South Wales, Sydney, Australia. PLoS ONE* 3(7).

- McDOUGALD, D., Rice, S., Weichart, D. and S., Kjelleberg, 1998. Nonculturability: adaptation or debilitation. *FEMS Microbiology Ecology*. 25: 1-9.
- MEBS, D., 2000. Toxicity in animals- Trends in evolution? *Toxicon*. Elsevier Science, Ireland 39: 87-96.
- METCALF, B.W. and M., Jung, 1976. Acetylene Derivatives of Amino Acids. U.S. Patent. 3: 959,356.
- MICHANEK, G., 1975. A preliminary appraisal of world seaweed resources. Seaweed resources of the ocean. *FAO Fisheries Technical Paper*. 138.
- MUIR, R.E., and Man-Wah Tan, 2008. Virulence of *Leucobacter chromiireducens* subsp. *solipictus* to *Caenorhabditis elegans*: Characterization of a Novel Host-Pathogen Interaction. *Applied Environmental Microbiology*. 74(13): 4185–4198.
- OKAMI, Y., 1986. Marine microorganisms as a source of bioactive agents. *Microbial Ecology*. 12:65–78.
- PFLEGER, B., Sherman, D., Nusca, T., Scaglione, J. and Y., Lee, 2008. Petrobactin Biosynthesis: A Target for Antibiotics and a Platform for Producing Specialty Chemicals . *Chemical and Biological Engineering*, University of Wisconsin Madison, Madison, WI. Life Sciences Institute, University of Michigan, Ann Arbor.
- PHILLIPS, N., 1995. Biogeography of Sargassum (Phaeophyta) in the Pacific basin. *Taxonomy of Economic Seaweeds*. California Sea Grant College System. 5: 107-125.
- RHEINHEIMER, G., 1992. *Aquatic microbiology*. 4th ed. John Wiley & Sons. West Sussex. United Kingdom.

- RICHARDSON, W.D., 1958. Preliminary investigations on the utilization of marine algae in the Caribbean. Abstracts from the International Seaweed Symposium. 3: 49–50.
- ROBLEDO, D., 1998. The seaweed resources of México. Seaweed resources of the world. 331–42.
- RONDON, M., Goodman, M. and J., Handelsman, 1999. The earth's bounty: assessing and accessing the soil microbial diversity. Trends Biotechnology. 17: 403 -409.
- ROUND, F.E., 1981. The Ecology of Algae. Cambridge University Press, Cambridge.
- SAITOU, N. and M., Nei, 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology Evolution. 4(4):406-25.
- SAN-MARTIN, A., Rovirosa, J., Astudillo, L., Sepulveda, B., Ruiz, D., and C., San-Martin, 2008. Biotransformation of the marine sesquiterpene pacifenol by a facultative marine fungus. Natural Product Research. 22 (18): 1627-1632.
- SAUERA, P., Gallob, J., Kesselová, M., Kolář, M. and D., Koukalová, 2005. Universal Primers for Detection of Common Bacteria Pathogencausing Prostetic Joint Infection. Biomedicine Pap Medicine Faculty University Palacky Olomouc Czech Republic. 149 (2): 285–8.
- SIEBER, T.N., Sieber-Canavesi, F. and C.E., Dorworth, 1991. Endophytic fungi of red alder (*Alnus rubra*) leaves and twigs in British Columbia. Canadian journal of botany. 69: 407–411.

- SOLIMAN, F.M., Fathy, M.M. and M.Y., Moussa, 2000. Phytochemical and Biological Investigation of the Green Alga: *Caulerpa prolifera Lamx*. Bulletin Faculty Pharmacy. 38: 99–107.
- STALEY, J. and A.K., Ta, 1985. Measurement of in situ activities of Nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. Annual Reviews in Microbiology. 39: 321-46.
- STROBEL, G., 2003. Endophytes as sources of bioactive products. Microbes and Infection. 5: 535- 544.
- SVERDRUP, H., Johnson, M. and R., Fleming, 1942. The Oceans. Their Physics, Chemistry, and General Biology. Prentice- Hall. 1-7.
- SUZUKI, M., Nakagawa, Y., Harayama, S. and S. Yamamoto, 2001. International Journal Systematic Evolutionary Microbiology. 51: 1639.
- TAMURA, K., Dudley, J., Nei, M. and S., Kumar, 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution.
- TARGETT, N.M. and A., Mitsui, 1978: Toxicity of subtropical marine algae using fish mortality and red blood cell hemolysis for bioassays. Journal of Phycology. 15(2): 181 – 185.
- TEAS, J., 2007. Seaweed and Soy: Companion Foods in Asian Cuisine and Their Effects on Thyroid Function in American Women. Journal Medicinal Food. 10: 90-100.
- TORSVIK, V., Ovreas, L. and T.F., Thingstad, 2002. Prokaryotic diversity-Magnitude, dynamics and controlling factors. Science. 296: 1064-1066.

- USAMI, M., Satake, M., Ishida, S., Inoue, A., Kau, Y. and T., Yasumoto, 1995. Palytoxin analogs from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. Journal of the American Chemical Society. 117: 5389-5390.
- WALLENTINUS, I., 2002. Introduced marine algae and vascular plants in European aquatic environments. Invasive Aquatic species of Europe – distribution impacts and management. Kluwer Academic Publishers. 27-52.
- ZHUANG, W., Tay, J., Maszenan, A., Krumholz, L. and S., Tay, 2003. Importance of Gram-positive naphthalene-degrading bacteria in oil-contaminated tropical marine sediments. Lett Applied Microbiology. 36 (4): 251-7.
- ZHANG, H. L., Hua, H. M., Pei, Y. H. and X.S., Yao, 2004. Anticancer activity and mechanism of *Scutellaria barbata* extract on human lung cancer cell line A549. Chemistry Pharmacology Bulletin. 52: 1029.
- ZOBELL, C. E. and H.C., Upham, 1944. A List of Marine Bacteria Including Descriptions of Sixty New Species. Bulletin Scripps Inst. Oceanology. 5: 239-92.

CAPÍTULO 2

Estudio de diversidad microbiana no dependiente de cultivo en dos géneros de actinomicetos marinos

Introducción

El inicio de la microbiología marina data del año 1884 cuando el profesor alemán Bernard Fischer reportó por primera vez el cultivo de una bacteria marina proveniente de aguas profundas del océano, y sugirió que las bacterias juegan un papel ecológico importante en su ambiente (Azam, 2001).

Estos primeros estudios en la microbiología marina fueron realizados estimando la abundancia de bacterias en el agua de mar y en los sedimentos marinos, basados en métodos tradicionales, tales como: diluciones seriadas, cuenta directa por microscopía, e identificación en placas con medio sólido (Xu et al., 1996).

Actualmente, contamos con nuevas y poderosas herramientas como las derivadas de la biología molecular, sensores remotos y exploraciones en aguas profundas, que han llevado a importantes descubrimientos en el estudio de la abundancia y diversidad de la vida microbiana y su papel en la ecología global (Jensen y Mafna, 2006).

Los estudios de las interacciones entre microbios marinos y otros organismos, siguen produciendo resultados intrigantes en los fenómenos de las cadenas alimenticias, simbiosis y patogenicidad. Algunos microbios marinos han producido daños ecológicos y enfermedades y ha sido necesario estudiar

los caminos y ciclos que estos microorganismos toman para poder manejarlos y controlarlos (Munn, 2004).

Finalmente, se ha encontrado que los microorganismos marinos tienen propiedades benéficas, que pueden dar lugar al desarrollo de nuevos productos y procesos en el campo de la Biotecnología Marina (Munn, 2004). Se tienen datos de una gran cantidad de metabolitos secundarios aislados de microorganismos marinos que presentan múltiples actividades que favorecen el tratamiento de diversos tipos de cáncer, tumores y enfermedades infectocontagiosas (Fenical y Jensen, 2006).

El presente capítulo provee información que muestra la diversidad de dos familias de actinobacterias (*Streptomycetaceae* y *Micromonosporaceae*) importantes en la producción de metabolitos secundarios, familias que se han hecho presentes en sedimentos marinos, y la manera en como el diseño de “cebadores”, algunos de ellos específicos de familia, determinan la diversidad encontrada en muestras ambientales.

Diversidad bacteriana en sedimentos marinos

La conceptualización de sedimentos marinos es “cualquier depósito de material insoluble, primariamente partículas de suelo y roca, transportadas desde áreas terrestres hacia el océano por viento, hielo y ríos, así como restos de organismos marinos, productos de vulcanización submarina, precipitados químicos de agua de mar, y materiales provenientes del espacio (meteoritos) acumulados en el suelo marino” (Burdige, 2005).

Los sedimentos marinos pueden clasificarse en varios tipos: biogénicos (derivados de plantas y animales), autogénicos (formados por precipitados del agua de mar), volcanogénicos (formado por partículas de erupciones volcánicas), cosmogénicos (partículas provenientes del espacio exterior) y terragénicos (partículas provenientes de la tierra) (Burdige, 2005).

Los sedimentos marinos empezaron a ser estudiados sistemáticamente con las expediciones del HMS *Challenger* entre los años 1872 y 1876. Los científicos de esta época evaluaron la importancia de estudiar estos depósitos de material insoluble en el océano, ya que éstos cubren aproximadamente el 70% de la superficie de la tierra, cualquier cosa que encontrasen en los sedimentos marinos sería abundante. Las investigaciones realizadas dieron resultados positivos, en donde se encontró una diversidad bacteriana considerable. Los estudios que han sido realizados hasta ahora muestran grupos bacterianos en este tipo de ambiente marino, como por ejemplo las bacterias Gram negativas sulfuroreductoras y algunos miembros de la clase *Proteobacteria*, dominan las áreas intercostales (Rappé et al., 2002). Otros estudios realizados cerca de la costa en plataformas continentales revelaron una alta abundancia de bacterias sulfuroreductoras, así como de otros miembros de la familia de *Proteobacteria*, incluyendo los géneros *Oceanospirillum* y *Marinomonas* (Goodfellow et al., 1988).

Aunque aún se conoce poco de la diversidad procariótica, su distribución y el papel biológico que juegan en los sedimentos marinos, los estudios ya realizados definen a esta comunidad como una población con una alta y

compleja diversidad, similar a la encontrada en los suelos terrestres, incluyendo la presencia de muchos grupos filogenéticos que son similares en sedimentos marinos (Bowman y Pa, 2003). Hoy en día, los sedimentos marinos han llegado a ser una inesperada fuente de diversidad microbiana con 37,000 especies de bacterias presentes por gramo (Rusch et al., 1987).

Actinomicetos y la Biotecnología

Las actinobacterias (Clase Actinobacteria, orden *Actinomycetales*) son bacterias Gram positivas, con alto contenido de guanina y citosina (G+C), encontradas mayormente en el suelo y sedimentos marinos. Juegan un papel importante en la descomposición del material orgánico, tal es el caso de la celulosa y la quitina, lo que conlleva a una producción de nutrientes en el suelo, siendo también un factor muy importante en la formación del humus (Schaal et al., 2006)

Otras actinobacterias habitan en plantas y animales, algunas de ellas son patógenas para el humano, como lo son algunos miembros de los géneros *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y algunas especies de *Streptomyces*. Sin embargo, los actinomicetos también han sido estudiados ampliamente por su habilidad para producir metabolitos secundarios, de ahí su gran interés comercial y farmacéutico (Stackebrandt et al., 1997). Aproximadamente, el 50% de los productos naturales provenientes de microbios reportados hasta el 2002, habían sido atribuidos a las actinobacterias (Bérdy, 2005).

Waksman y Woodruff en 1940, descubrieron bacterias aisladas del suelo que producían actinomicina (antibiótico producido por actinobacterias), este descubrimiento los hizo acreedores al premio Nobel. Desde entonces cientos de antibióticos provenientes de fuentes naturales han sido descubiertos en microorganismos terrestres, especialmente actinobacterias del género *Streptomyces*.

La eritromicina por ejemplo, y sus derivados antibióticos producidos por actinomicetos, deben su actividad antibacteriana a la capacidad de inhibir la síntesis de proteínas a través de la unión al sitio peptidiltransferasa de la subunidad 50S ribosomal de la bacteria. Hay 3 derivados cetólicos semisintéticos de la eritromicina, conocidos como cetromicina, EP-420 y BAL-19403, que actualmente se encuentran en desarrollo clínico. Los primeros cetólicos aprobados fueron la telitromicina (Ketek), la cual fue desarrollada por Sanofi-Aventis y comercializada en el 2001 en Europa, en el 2003 en Japón y en el 2004 en Estados Unidos y la eritromicina que también actúa como agonista (sustancia que se une a un receptor específico produciendo una respuesta en la célula) del receptor motilin y dos derivados semisintéticos, encontrándose bajo desarrollo para el tratamiento del desorden de motilidad gástrica (Soriano et al., 2000)

La tiacumicina B (difimicina, OPT-80, PAR-101), es idéntica a la lipiarmicina A3184 y Clostomicina B1 es un derivado de macrolactona de actinomiceto aislado por Abbott y es considerado como el mayor componente del complejo antibiótico tiacumicina. Su actividad antibacteriana está relacionada

a la inhibición de la síntesis del ARN bacteriano. La empresa Optimer Pharmaceuticals ha evaluado la tiacumicina B, cuyo compuesto se encuentra en la fase III, de las pruebas para el tratamiento de la diarrea asociada a *Clostridium difficile* (CDAD) (Ackermann et al., 2004).

Otro antibiótico bien conocido proveniente de varias especies de *Streptomyces* es la tetraciclina, inicialmente descubierta a finales del año de 1940, ha mostrado una actividad en contra de bacterias Gram positivas y Gram negativas, uniéndose reversiblemente a la subunidad del 30 S del ribosoma de la bacteria deteniendo la síntesis de proteínas. De los primeros miembros de la nueva generación de tetraciclinas, como en el caso de tigeciclina 6, que es una aminometilciclina descubierta por Paratek y está siendo evaluada en la fase II de las pruebas para el tratamiento de infecciones hospitalarias (Butler, 2008).

Identificación molecular de *Streptomycetaceae* y *Micromonosporaceae* en sedimentos marinos

El gran deseo humano de comprender y utilizar todo a su alrededor lo han llevado al cultivo de bacterias de casi todos los hábitats que existen en la tierra para estudios relacionados con diversidad, medicina, papeles ecológicos y aplicaciones biotecnológicas.

Las bacterias que fueron aisladas inicialmente, provinieron de fuentes directamente asociadas con humanos (como llagas, cortadas, saliva, pus, sangre, orina y heces fecales), la mayoría con pH neutro y a temperatura ambiente. Después, estos organismos fueron aislados de ambientes más

hostiles como vientos termales, salmueras saturadas, estanques acídicos y glaciares. El aislamiento exitoso de bacterias en el hielo polar y corteza terrestre han llevado a la hipótesis de que la vida bacteriana podría existir inclusive en otros planetas.

Los estudios originados durante estas dos últimas décadas han revelado que la mayoría (más del 99%) de las bacterias presentes en muchas muestras ambientales no han podido ser cultivadas en el laboratorio, lo que deja un campo oscuro en la investigación de las funciones ecológicas y aplicaciones biotecnológicas que hasta hoy son inexploradas.

Los estudios de diversidad microbiana no dependientes de cultivo (la mayoría basados en un análisis de secuenciación del gen 16S ARNr) han mostrado una proporción enorme de bacterias no cultivadas todavía pertenecientes a nuevos genotipos, clases y divisiones del dominio *Eubacteria* y *Archaea* (Bintrim et al., 1997; Hugenholtz et al., 1998). Estos estudios han revelado la presencia de nuevas clases de bacterias aún en muestras muy bien caracterizadas como placas dentales, agua de mar y suelo de jardín.

Con el uso de estos análisis moleculares de diversidad bacteriana, se ha logrado la identificación de 40 divisiones de *Eubacteria*, incluyendo 13 divisiones de bacteria consideradas como nuevas, ya que no tienen ningún representante cultivable. Estos estudios también revelan la presencia de *Archaea* en hábitats como suelo, agua de mar, etc. Al contrario de previas creencias que *Archaea* solo habitaba en ambientes extremos (Euzéby, 1997)

La aplicación de técnicas moleculares para la clasificación de microorganismos ha hecho posible una identificación más fidedigna de las relaciones evolutivas y además, estas clasificaciones se han hecho con contenido genético y no con evaluaciones morfológicas vagas y subjetivas (Euzéby, 1997). Comparando el gene 16S ARNr de cepas cultivables de bacterias y realizando un examen detallado de características metabólicas y fisiológicas como las proteínas de la pared celular y metabolismo del carbono, se ha expandido nuestro conocimiento sobre la diversidad bacteriana, dando como resultado la descripción de más de 16 phyla de bacteria hasta ahora (Euzéby, 1997).

La amplificación y secuenciación del gene 16S ARNr ha probado ser una metodología muy útil para el estudio de la diversidad filogenética de cepas cultivables, pues ha permitido lo que antes era imposible: el estudio de diversidad bacteriana sin la necesidad de cultivo.

Esta técnica desarrollada en los laboratorios Pace, Universidad de Colorado, a mediados de 1980's (Niven y MacLeod, 1980), basada en la extracción del ADN genómico total directamente de la muestra ambiental, amplificando el gen 16S ARNr por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), clonando los productos amplificados dentro de un vector, y por último; secuenciando esos segmentos de ADN, dan como resultado un estudio de diversidad filogenética sin la necesidad de cultivar las cepas de las bacterias presentes en las muestras.

Uso de cebadores en estudios de diversidad

Los cebadores son segmentos de cadenas de ácidos nucleicos que sirven como punto de inicio en la replicación del ADN, estos son usados en una gran variedad de técnicas moleculares en donde es necesario el uso de la "reacción en cadena de la polimerasa" (PCR), en este caso; los estudios de diversidad.

La elección de los cebadores que se van a utilizar en cada estudio es directamente proporcional a los resultados que se obtendrán, mostrando así su importancia. Este capítulo demuestra que utilizando dos pares de cebadores diferentes en una misma muestra ambiental, los resultados son distintos. Los cebadores en este caso, son usados para mostrar la diversidad bacteriana existente en muestras ambientales. Algunos estudios en donde utilizaron cebadores para evaluar la diversidad presente muestran por ejemplo, que mientras el 10% de las clonas provenientes de lugares cerca de la costa americana del Pacífico Norte representaron un nuevo grupo de bacterias Gram-positivas (Goodfellow et al., 1988). Los sedimentos de la costa Ártica revelaron la presencia de las especies de bacteria *Clostridium*, *Microthrix* y *Anaerobranca* cuando fueron utilizados cebadores específicos para bacterias Gram-positivas (Rappé et al., 2002).

En el caso del estudio de las actinobacterias, la mayoría de los estudios de diversidad microbiana no dependientes de cultivo han mostrado en repetidas ocasiones que al emplear cebadores generales de bacteria se identifica muy poca cantidad de bacterias de la familia *Actinomycetes*, confirmando una baja

abundancia en sedimentos marinos en estudios de diversidad microbiana no dependientes de cultivo, a pesar de que en estudios de diversidad microbiana dependientes de cultivo, donde se utilizaron condiciones favorables para el crecimiento de actinobacterias en sedimentos marinos, hubo una diversidad considerable de esta familia (Prieto-Davo et al., 2008).

Se hace lógico entonces usar cebadores específicos para estudiar la distribución de filotipos no comunes. Hay muy pocos estudios que han utilizado cebadores específicos de familias para describir la diversidad de actinobacterias presentes en sedimentos marinos, aún así, se ha encontrado una predominancia de la familia de *Streptomyces*, entre los 5-12 cm del núcleo del sedimento marino, mientras *Rhodococcus* parece dominar entre los 15-18 cm y 43-46 cm de las muestras de sedimento marino (Schloss y Da, 2004).

En el pasado, miembros de los géneros *Streptomyces* y *Micromonospora* han probado ser una excelente fuente de productos naturales bioactivos (Bérdy, 2005; Fenical y Jensen, 2006). Hasta ahora, se ha logrado identificar una gran cantidad de géneros y especies de actinobacterias nuevas, algunas de ellas representadas en la figura 6.

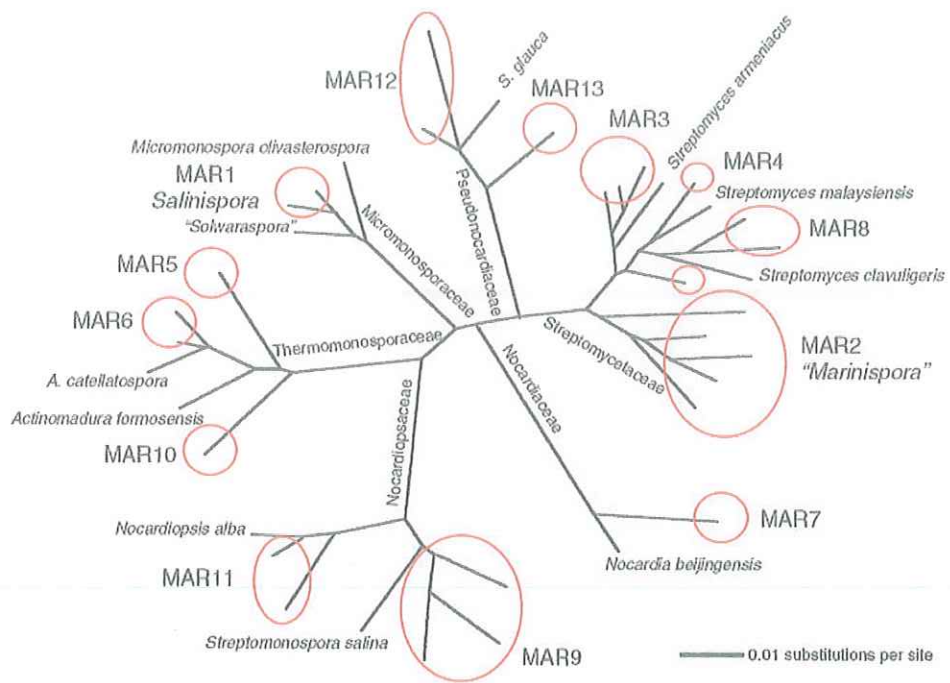


Figura 6. Árbol radial mostrando la relación filogenética de los 13 grupos de actinomicetos provenientes de muestras marinas, con 6 diferentes familias, incluyendo los nuevos géneros de *Salinispora* y el grupo de los MAR2 relacionados al género *Marinispora* (Tomado de Gontang et al., 2007).

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la diversidad presente de dos géneros de actinomicetos (*Streptomycetacea* y *Micromonosporacea*) utilizando cebadores específicos de familia en muestras de sedimento marino cerca de la costa de San Diego.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la diversidad microbiana no dependiente de cultivo para el diseño de técnicas de cultivo específicas.
- Comparar los resultados obtenidos, entre el uso de cebadores generales de familia y los cebadores específicos de familia

HIPOTESIS

Los estudios de diversidad microbiana no dependientes de cultivo y el uso de cebadores específicos de familia y cebadores generales son herramientas cruciales para estudios de diversidad en muestras de sedimento marino y la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios.

MATERIALES Y MÉTODOS

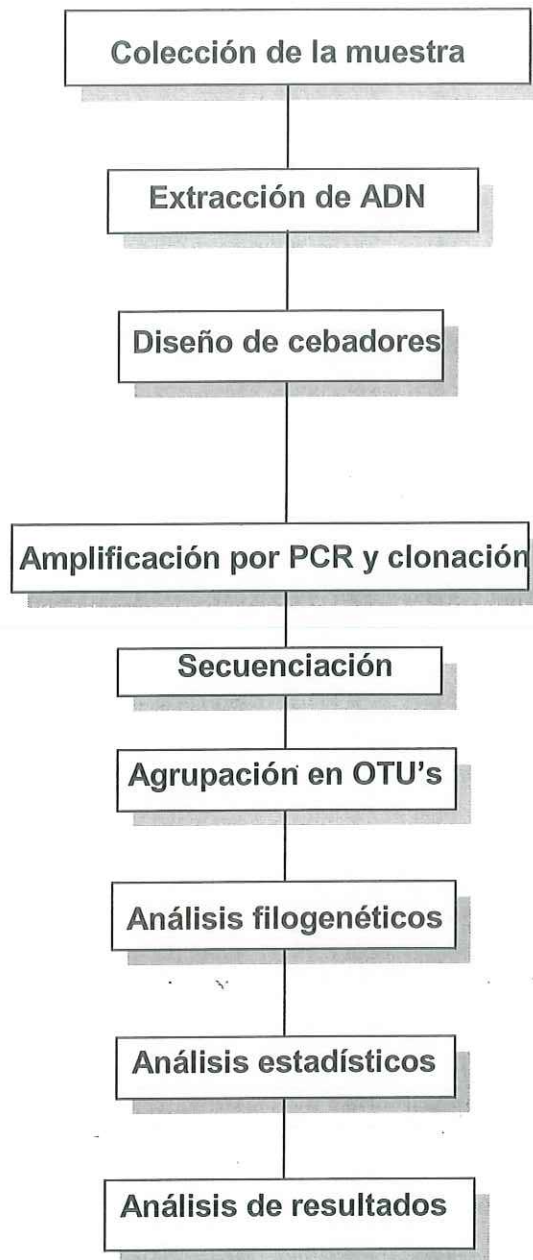


Figura 7. Diagrama de flujo de la metodología seguida.

Colección de muestras

Las muestras de sedimentos marinos fueron colectadas en localidades fuera del área de San Diego, Ca., a profundidades de 100 a 2000 m. La muestra SD06-09-4A fue tomada el 18 de Abril del 2006 a una localidad cerca de la costa ($32^{\circ} 11.09'$ N y $118^{\circ} 18.02'$ O) a una profundidad de 1850 m. Mientras que las muestras SD06-12 y SD06-13 fueron colectadas entre San Diego ($32^{\circ} 39.75'$ N y $117^{\circ} 34.3'$ O) y la frontera internacional US/México ($32^{\circ} 26.5'$ N y $117^{\circ} 55.0'$ O) a profundidades de 1133 m y 1900 m respectivamente.

Las tres muestras fueron colectadas usando un dispositivo de extracción diseñado y construido en el Instituto Oceanográfico de Scripps, UCSD. Se tomó material de los 5 cm de profundidad de la parte superior de cada muestra para el procesamiento, excepto por una de las muestras lejos de la costa, la cual fue procesada como núcleo y disectada en segmentos de 5 cm entre cada uno (A-E), aproximadamente 1 gr de sedimento húmedo fue colocado en tubos eppendorf de 1.5 mL, que contenían 1 mL de Buffer de lisis sacarosa (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.25 M Sacarosa), e inmediatamente fueron almacenadas para su transportación en un contenedor a 4°C , el almacenamiento en periodos largos fue realizado a -20°C . Para este estudio, se usaron solo las secciones de los primeros 5 cm del núcleo.

Extracción de ADN genómico microbial

El ADN genómico microbial de las muestras ambientales fue extraído usando el kit de de extracción de ADN “*Soil DNA extraction kit*” (DNeasy tissue kit, cat. No. 69506), de acuerdo con el protocolo del fabricante (Qiagen Corp. Ca. USA). Los cebadores descritos por Maldonado et al., (2005), fueron usados para detectar el gen 16S ARNr de los miembros de la familia *Streptomycetaceae* y el cebador forward (M2F) para la familia *Micromonosporaceae*, éste fue usado en combinación con el cebador diseñado específicamente para este estudio (A4R) (Prieto-Davo et al., 2008).

Cebadores

Tabla 12. Cebadores generales y específicos de familias, para la obtención de clonas de la muestra ambiental SD06-09-4A.

Cebadores	Oligonucleótidos	Región	Cita Bibliográfica
<i>Actinomicetaea</i>			
Act235	5'-CGCGGCCTATCAGCTTGTTG-3'	(<i>E. coli</i> 235-255)	Maldonado et al., 2005
Act878	5'-CCGTACTCCCCAGGCGGGG-3'	(<i>E. coli</i> 878-897)	Maldonado et al., 2005
<i>Streptomycetaceae</i>			
Sm6F	5'-GGTGGCGAAGGCGGA-3'	(<i>E. coli</i> 721-735)	Maldonado et al., 2005
Sm5R	5'-GAACTGAGACCGGCTTTTTGA-3'	(<i>E. coli</i> 1283-1303)	Maldonado et al., 2005
<i>Micromonosporaceae</i>			
M2F	5'-CCAGCCCCACCTTCGAC-3'	(<i>E. coli</i> 492-508)	Maldonado et al., 2005
A4R	5'-GGAAGCCCCCGCCASTGTCC-3'	(<i>E. coli</i> 1030-1050)	Prieto-Davo et al., 2008

Diseño de cebadores

El diseño del cebador A4R específico de familia, se llevó a cabo primeramente obteniendo las secuencias que están accesibles en la base de datos del RDP (Ribosomal Database Project), las secuencias específicas de familias obtenidas se alinearon utilizando el programa ClustalX (Staley y Ta, 1985), ya alineadas las secuencias se exportaron al programa Bioedit (Hall y Brown, 2001).

Las secuencias fueron editadas mediante la eliminación de espacios vacíos que quedaron, con la ayuda del programa se buscaron sitios conservados en todas las secuencias, se probaron segmentos de secuencias entre 15 y 20 bases nucleotídicas de longitud, con el software "Probe Match", el cuál evaluó la temperatura de fusión (T_m) y la formación de dímeros. Una vez diseñados los cebadores con T_m recomendado y sin formación de dímeros, se analizaron alineando las secuencias con otras secuencias de la base de datos del "GeneBank" con el uso de la herramienta "BLAST" (NCBI), para comprobar que las secuencias que se amplificaron eran correctas.

Amplificación por PCR y clonación

La amplificación de PCR se obtuvo a partir de $18-20 \text{ ng mL}^{-1}$ del ADN ambiental, se efectuó por triplicado por cada muestra como sigue: para los cebadores generales Act235 y Act878 se utilizó un programa tipo touchdown comenzando con una desnaturalización inicial 95°C por 5 minutos, seguido por 10 ciclos de 95°C por 45 s, 72°C por 45 s y 72°C por 1 min, seguidos por 15

ciclos de 95 °C por 45 s, 68 °C por 45 s y 72 °C por 1 min, seguido por 5 min de extensión a 72 °C. Para los cebadores M2F y A4R (*Micromonosporaceae*) se llevó a cabo con una desnaturalización inicial 95 °C por 10 minutos, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 45 s, 65 °C por 45 s y 71 °C por 1 min, seguido por 10 min de extensión a 72 °C.

Para los cebadores Sm6F y Sm5R (*Streptomycetaceae*), el programa fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95 °C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 30 s, 65 °C por 45 s y 72 °C por 1 min, seguido por 1 min de extensión a 72 °C, 30 s a 55 °C y 30 s a 95 °C.

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

El ADN plasmídico fue extraído usando el "QiaPrep® MiniPrep extraction kit", de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen). El ADN plasmídico fue sujeto a un análisis de enzimas de restricción BstX I (New

England BioLabs) y el producto fue corrido por electroforesis en gel de agarosa al 1% para confirmar la presencia del inserto con el tamaño correcto.

Secuenciación

Los plásmidos que contenían insertos del 16 ARNr de las familias de *Streptomyces* y *Micromonospora* fueron secuenciados comercialmente (Rebecca and John Moore Cancer Center Sequencing Facilities) usando el cebador M13 incluido en el vector (Invitrogen).

Agrupación en OTU's

Para todos las clonas de *Streptomyces*, las secuencias de los genes del 16S ARNr (560 bp) fueron alineados con OTU's basados en un 98% de identidad, cada OTU fue agrupada con clonas que comparten un 98% de similitud en sus secuencias 16S ARNr. Las secuencias fueron usadas para generar árboles filogenéticos. Para los miembros de la familia *Micromonosporaceae* se siguió el mismo procedimiento usando secuencias a una longitud de 536 bp y para las clonas donde se utilizaron los cebadores generales se utilizaron las secuencias a una longitud de (600 bp).

Análisis Filogenético

Las secuencias fueron analizadas usando la base de datos BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) función contenida de la Base de datos del GeneBank (Altschul et al., 1990).

Las secuencias fueron alineadas usando el programa ClustalX (Staley y Ta, 1985) y éstas fueron importadas dentro del programa Bioedit (Hall y Brown, 2001) donde una alineación manual fue hecha. Los árboles filogenéticos fueron elaborados para las familias *Streptomycetaceae* y *Micromonosporaceae* y con las clonas de cebadores generales con las siguientes indicaciones: Bootstrap test of phylogeny (1000 replicas), p-distance neighbor joining, usando el programa MEGA4 (Tamura et al., 2007), utilizando entre 435, 572 y 600 bp respectivamente.

Análisis Estadísticos

Índice de Simpson

El índice de Simpson (también conocido como índice de diversidad de especies) es uno de varios, usado para medir la diversidad de una muestra o un campo de muestreo, el cual cuantifica la biodiversidad de un hábitat, tomando en cuenta el número de especies presentes, así como la abundancia relativa de cada especie. El índice de Simpson representa la probabilidad que dos individuos seleccionados aleatoriamente en el hábitat pertenezcan a la misma especie (Simpson, 1951). El índice de Simpson se obtuvo mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$D = \frac{\sum n(n-1)}{N(N-1)}$$

Donde $n =$ es el número total de organismos de una especie en particular, y $N =$ es el número total de organismos de todas las especies. $D = 0$ representa diversidad infinita y $D=1$ representa una diversidad nula. Esto es, entre mayor sea el valor de D , la diversidad es menor.

Índice de Shannon

El índice de diversidad de Shannon (H) mide la probabilidad de seleccionar todas las especies en la proporción con que existen en la población, es decir, mide la probabilidad de que una muestra seleccionada al azar de una población infinitamente grande contenga exactamente n_1 individuos de especie 1, n_2 de especie 2,... y n_s individuos de la especie S (Greig-Smith, 1983). Esto es, (1) $H = 0$ si solamente hay una especie en la muestra y (2) $H= 1$ si su valor está al máximo (cuando hay 2 o más especies, es máxima si todas las especies tienen el mismo número de individuos, es decir, cuando las proporciones de todas las especies son iguales, $p_1 = p_2 = \dots = p_s$, esto es, el índice H aumenta a medida que aumenta la riqueza (el número de especies en la muestra) y los individuos se distribuyen más homogéneamente entre todas las especies.

RESULTADOS

En este estudio se utilizaron tres diferentes pares de cebadores para estudiar la diversidad de actinomicetos en sedimentos marinos, los cebadores Act235 y Act878 (Maldonado et al., 2005), los cuales crearon un producto final de 600 bp, los cebadores específicos de familia A4R (Prieto-Davo et al., 2008) junto con el primer M2F (Maldonado et al., 2005) los cuales dieron productos de 536 bp para la familia de *Micromonosporaceae*. Para la familia de *Streptomyceae* se utilizaron los cebadores Sm6F y Sm5R (Maldonado et al., 2005), dando un producto final de 560bp.

Diseño de Cebadores

Micromonosporaceae:

A4R 5'-GGAAGCCCCCGCCASTGTCC-3' (*E. coli* 1030-1050) (Prieto-Davo et al., 2008).

M177F 5'-GTTGGTGGTGGAAAGTTTTT-3'

A269R 5'-CGGTCGCCCTCTACG -3'.

Se analizaron las secuencias de actinobacterias pertenecientes al género de *Micromonospora* que fueron obtenidas en la base de datos del RDP II y GeneBank, las secuencias se alinearon y se buscaron los sitios conservados, se probaron varias secuencias de bases nitrogenadas, analizando la probabilidad de formación de dímeros y estructuras "hairpin" (estructuras formadas por cebadores cuyas bases nitrogenadas se unen entre sí). Los

cebadores que se obtuvieron fueron probados con la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), a pesar, de los cuidados y programas para el diseño de los cebadores, los oligonucleótidos M177 F y A269R no amplificaron ningún producto, mientras que el cebador A4R junto con el cebador M2F (Maldonado et al., 2005) produjeron segmentos de 536 bp para la familia de *Micromonosporaceae* a una temperatura de alineamiento de 72⁰C, mientras que los cebadores específicos para la familia de *Streptomyceae* se utilizaron los cebadores Sm6F y Sm5R con una temperatura de alineamiento de 65⁰C (Maldonado et al., 2005) creando un producto final de 560bp.

Diversidad de actinomicetos en sedimentos marinos

Se obtuvieron un total de 40 clonas, provenientes de la muestra SD06-09-4A recolectada de sedimentos marinos a una profundidad de 1200 m cerca de la costa de San Diego, Ca. En la tabla 13 se muestra los vecinos filogenéticos más cercanos encontrados, al hacer la comparación de secuencias en el BLAST, los porcentajes de similitud entre ellos, el número de acceso de la base de datos del GeneBank y la fuente de donde provienen los vecinos filogenéticos, observándose una tendencia hacia muestras recolectadas en sedimentos marinos, como en el caso del presente trabajo.

Tabla 13. Información sobre vecinos más cercanos con las clonas secuenciadas utilizando cebadores generales de actinomicetos Act235 y Act878 en muestras marinas.

Clonas	Número de acceso	Vecino filogenético más cercano	% de Identidad	Fuente
A4A1, A4A24	EF999353	Bacteria no cultivable clon TopBa23	95.03	Estuario
A4A2	DQ811925	Clon de bacteria no cultivable	96.68	Manglar
A4A3	DQ269040	Clon de bacteria no cultivable	98.12	Macroalga marina
A4A4, A4A5, A4A6, A4A8, A4A9, A4A11, A4A12, A4A14	AY592136	Clon de bacteria no cultivable Kazan-2B	99.24	Sedimento de volcán
A4A7	AY568903	Bacteria no cultivable aislado JH12	94.17	Intermareal
A4A10	AY592650	Clon de bacteria no cultivable Napoli-2B	98.79	Mediterráneo
A4A13, A4A23, A4A33, A4A35	AY592110	Clon de bacteria no cultivable Kazan-1B	95.32	Sedimento
A4A15	AY592137	Clon de bacteria no cultivable Kazan-2B	99.24	Sedimento
A4A16	AY218680	Clon de bacteria no cultivable KD8-112	93.59	Sedimento
A4A17, A4A18	AY124428	Clon de actinobacteria no cultivable SDa02	99.4	Ambiental
A4A19	AB305477	Bacteria no cultivable	98.61	Sedimento Hidrotermal
A4A20	EU287420	Clon de bacteria no cultivable S26-120	99.09	Sedimento de la superficie Ártica
A4A21	DQ351811	Clon de actinobacteria no cultivable	94.13	Sedimento marino
A4A22, A4A34	AY592121	Clon de bacteria no cultivable Kazan-1B	95.63	Sedimento
A4A24	EF999353	Clon de bacteria no cultivable TopBa23	94.58	Sedimento de río Estuario
A4A25	AY592135	Clon de bacteria no cultivable Kazan-2B	99.09	Sedimento
A4A26	DQ067020	Clon de bacteria no cultivable pLW-79	93.45	Lago de Agua dulce
A4A27	EF460086	Clon de bacteria no cultivable 261b3	93.9	Sedimento del mar Báltico
A4A28	AB305473	Bacteria no cultivable	97.74	Sedimento Hidrotermal
A4A29, A4A31, A4A38	EF491467	Clon de bacteria no cultivable EP1-34	98.94	Sedimento en agua profundas
A4A30	AY225656	Clon de bacteria no cultivable AT-s3-3	98.94	Sedimento Hidrotermal
A4A36	AJ966578	Bacteria no cultivable	99.09	Sedimento en aguas profundas
A4A37	AY592636	Clon de bacteria no cultivable Napoli-2B-10	98.79	Volcán
A4A39	AY592137	Clon de bacteria no cultivable Kazan-2B	99.24	Sedimento
A4A40	AB177239	Bacteria no cultivable	93.5	Sedimento marino

En la figura 8, se reporta el árbol filogenético construido en base a las clonas obtenidas y los vecinos filogenéticos encontrados, también se incluyen secuencias de bacterias de las familias *Streptomycetaceae* y *Microcomonosporaceae* para realizar una comparación y mostrar que los organismos obtenidos con los cebadores generales de actinomicetos, no amplifican miembros de éstas familias a menos que se utilicen cebadores específicos de éstas. Se puede contemplar una clara semejanza entre las clonas, formando ramificaciones muy claras en el árbol filogenético.

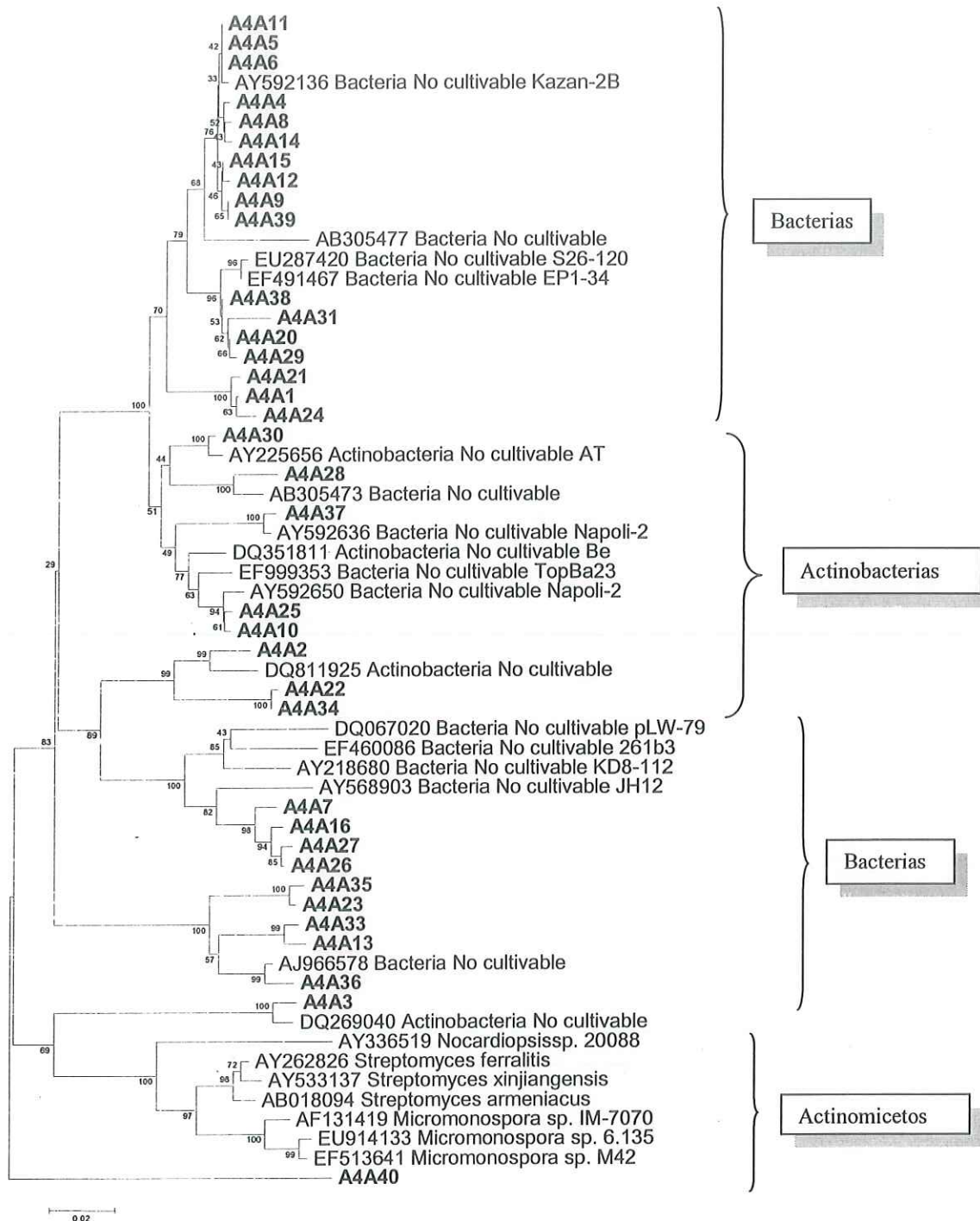


Figura 8. Relación evolutiva de 60 taxa con clonas secuenciadas utilizando los cebadores generales de actinomicetos Act235 y Act878 en muestras marinas. La historia evolutiva fue evaluada usando el método de "Neighbor-Joining" (Rusch et al., 1987). Con un total de 435 bases nucleotídicas, el análisis filogenético fue producido por MEGA4 (Tamura et al., 2007).

Índice de Shannon y Simpson en Actinomicetos

Tabla 14. Valores de n y N para el cálculo de D, en el índice de Shannon y Simpson para las clonas generales.

Clonas	Número de Acceso	Número (n)	n(n-1)
A4A1, A4A24	EF999353	2	2
A4A2	DQ811925	1	0
A4A3	DQ269040	1	0
A4A4, A4A5, A4A6, A4A8, A4A9, A4A11, A4A12, A4A14	AY592136	8	56
A4A7	AY568903	1	0
A4A10	AY592650	1	0
A4A13, A4A23, A4A33, A4A35	AY592110	4	12
A4A15	AY592137	1	0
A4A16	AY218680	1	0
A4A17, A4A18	AY124428	2	2
A4A19	AB305477	1	0
A4A20	EU287420	1	0
A4A21	DQ351811	1	0
A4A22, A4A34	AY592121	2	2
A4A24	EF999353	1	0
A4A25	AY592135	1	0
A4A26	DQ067020	1	0
A4A27	EF460086	1	0
A4A28	AB305473	1	0
A4A29, A4A31, A4A38	EF491467	3	6
A4A30	AY225656	1	0
A4A36	AJ966578	1	0
A4A37	AY592636	1	0
A4A39	AY592137	1	0
A4A40	AB177239	1	0
Total (N)		40	
$\sum n(n-1)$			80

En la tabla 14 se encuentra el patrón de datos necesarios para el cálculo de los índices de Shannon y Simpson, el número de acceso de los vecinos filogenéticos más cercanos y el nombre de las clonas.

El índice de Simpson, dió como resultado un valor de 0.051280 .

$$D = \frac{80}{40(39)} \quad D = \frac{80}{1560} \quad D = 0.051280$$

Los valores de los índices obtenidos que se muestran en la tabla 15, nos habla de una diversidad relativamente grande, utilizando solamente 40 clonas. Seguramente los índices de diversidad serían menores si incrementáramos el número de clonas en el estudio.

Tabla 15. Índices de Shannon y Simpson para las clonas secuenciadas con los cebadores generales de actinomicetos Act235 y Act878 en muestras marinas.

Abundancia total	Índice de Shannon (H)	Índice de Simpson (D)
80	1.005	0.051

Diversidad de *Streptomyces* en sedimentos marinos

De un total de 40 clonas secuenciadas con los cebadores específicos de la familia de *Streptomycetaceae*, 23 clonas presentaron secuencias semejantes al género *Streptomyces*, lo que nos habla de una especificidad relativa, la fuente en donde se obtuvieron los organismos que muestran una similitud con las clonas obtenidas en este proyecto es muy variada, algunos aislados de hongos, otros del género *Streptomyces* en suelo y sedimentos. Las especies

mayormente encontradas fueron: *Streptomyces sp.*, compartiendo una similitud con 16 clonas obtenidas de sedimentos marinos, 6 de los vecinos filogenéticos fueron aislados de hongos, 6 de suelo y sólo 3 fueron provenientes de los sedimentos, como se muestra en la tabla 16.

Tabla 16. Información sobre vecinos más cercanos con las clonas secuenciadas utilizando cebadores específicos de *Streptomyces* Sm6F y Sm5R en muestras marinas.

Clonas	Número de acceso	Vecino filogenético más cercano	% de Identidad	Fuente
S4A3, S4A8, S4A2, S4A28, S4A31, S4A32	AF345862	<i>Streptomyces sp.</i>	97.46	Hongos
S4A4, S4A5	AB249917	<i>Streptomyces glomeratus</i>	100	Cepa de colección
S4A6	EU477237	<i>Streptomyces sp.</i>	99.83	Playa
S4A7, S4A30	AB180761	<i>Streptomyces sp.</i>	97.79	Suelo
S4A9, S4A10, S4A26	AB373970	<i>Streptomyces sp. KS16</i>	98.73	Suelo
S4A12, S4A33	DQ395912	Clon de bacteria no cultivable	88.64	Agua de Mar profunda
S4A14	EU214914	<i>Streptomyces sp. CNP-942</i>	98.98	Sedimento marino
S4A15	DQ026655	<i>Streptomyces prasinosporus</i>	89.98	Cepa de colección
S4A16	AB184665	<i>Streptomyces glaucus</i>	84.88	Cepa de colección
S4A18	EF012136	<i>Streptomyces sp. s6-212</i>	99.82	Suelo de Manglar
S4A22	DQ144233	<i>Actinomycetales bacterium</i>	99.66	Esponja marina
S4A23	AJ518307	Bacteria no identificada	96.15	Sedimento
S4A24	EU119192	<i>Streptomyces sp. HBUM87110</i>	97.8	Suelo
S4A25	EU544236	<i>Streptomyces sp. SD 575</i>	98.83	Lesiones de los pistilos marchitos
S4A27	EU216596	<i>Streptomyces recifensis</i>	99.49	Indefinido
S4A35	AF421762	<i>Chloroflexaceae</i> no cultivada	100	Muestra ambiental
S4A36	EU099411	Streptomycetaceae bacterium	100	Sedimento marino
S4A37	EU073782	Bacteria <i>Firmicutes</i> no cultivable	100	Carbón del subsuelo
S4A38	EF562578	<i>Methanosarcinales archaeon</i> no cultivable	92.95	Pasta de columna de papel

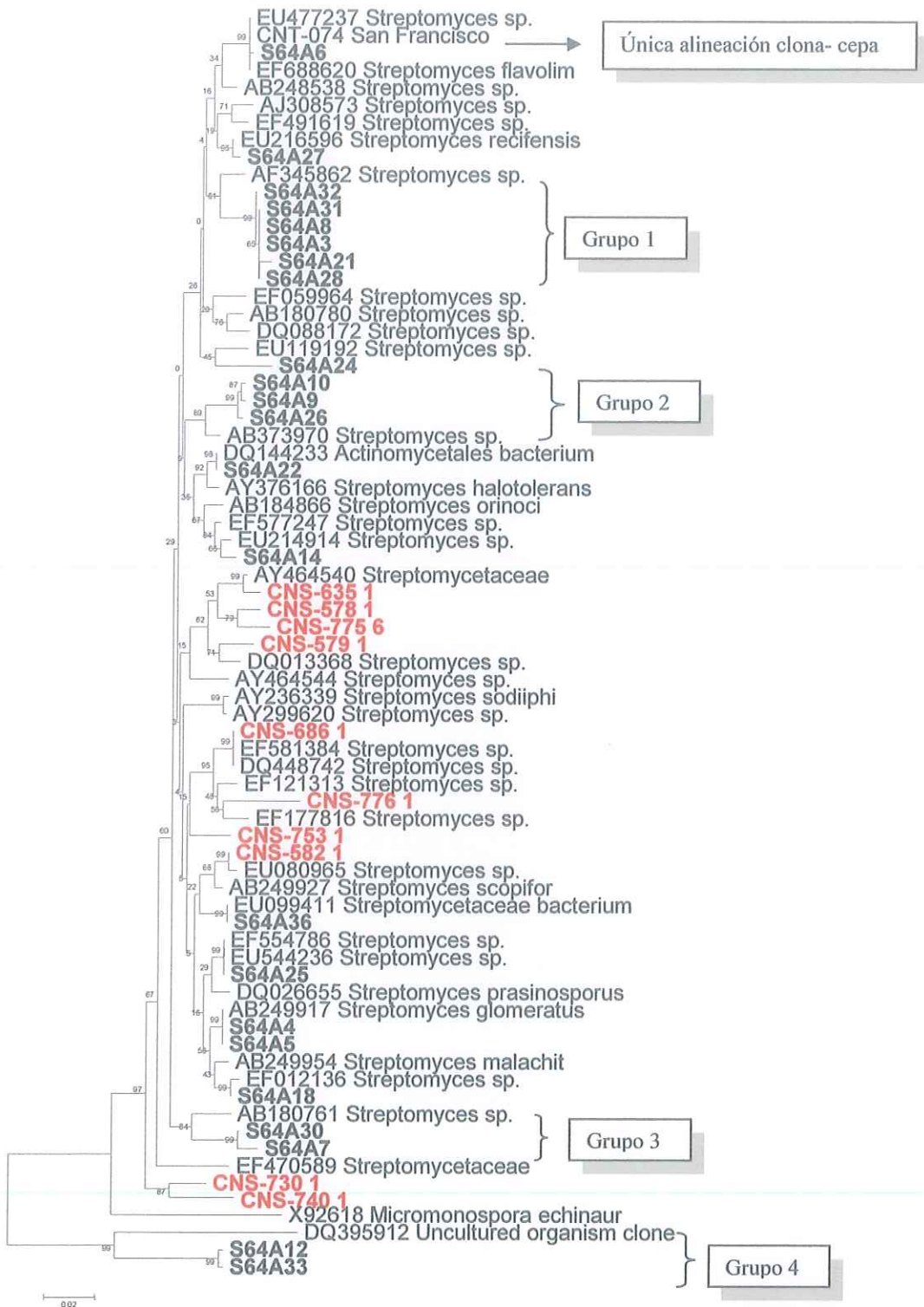


Figura 9. Relación evolutiva de 73 taxa con clonas secuenciadas y cepas cultivables utilizando cebadores específicos de *Streptomyces* Sm6F y Sm5R en muestras marinas. Las clonas son identificadas con los prefijos "S64A" y las cepas cultivables contienen los prefijos "CNS" y "CNT".

A pesar de que, de las 40 clonas secuenciadas solo se obtuvieron 29 clonas con similitud al género *Streptomyces*, sólo 6 de ellos mostraron representantes obtenidos de ambientes marinos, como se muestra en la tabla 17.

Tabla 17. Total de clonas con similitud a vecinos hipotéticamente marinos y terrestres.

Similitud con especies marinas	%	Similitud con especies no marinas	%
S4A12	88.64	S4A3	97.46
S4A14	98.98	S4A4	100
S4A22	99.66	S4A5	100
S4A23	96.15	S4A6	99.83
S4A33	88.64	S4A7	97.46
S4A36	100	S4A8	97.46
TOTAL	6	S4A9	97.73
		S4A10	98.73
		S4A15	89.98
		S4A16	84.88
		S4A18	99.82
TOTAL CLONAS	29	S4A21	96.95
		S4A24	97.8
		S4A25	98.83
		S4A26	97.77
		S4A27	99.49
		S4A28	97.46
		S4A30	97.79
		S4A31	97.46
		S4A32	97.46
		S4A35	100
		S4A37	100
		S4A38	92.95
		TOTAL	23

En la figura 10 se muestra un árbol filogenético construido en base a las 6 clonas cuyas secuencias reflejaban una identidad marina, éstos fueron comparados con representantes terrestres de la misma especie y otras clonas con identidad terrestre, el resultado no fue alentador ya que se esperaba encontrar un patrón el cual pudiera diferenciar las secuencias de especies terrestres de las marinas, el análisis fue realizado con 579 bp, es necesario utilizar el gen completo del 16S ARNr para poder asegurar y discernir que no existen patrones entre los dos grupos.

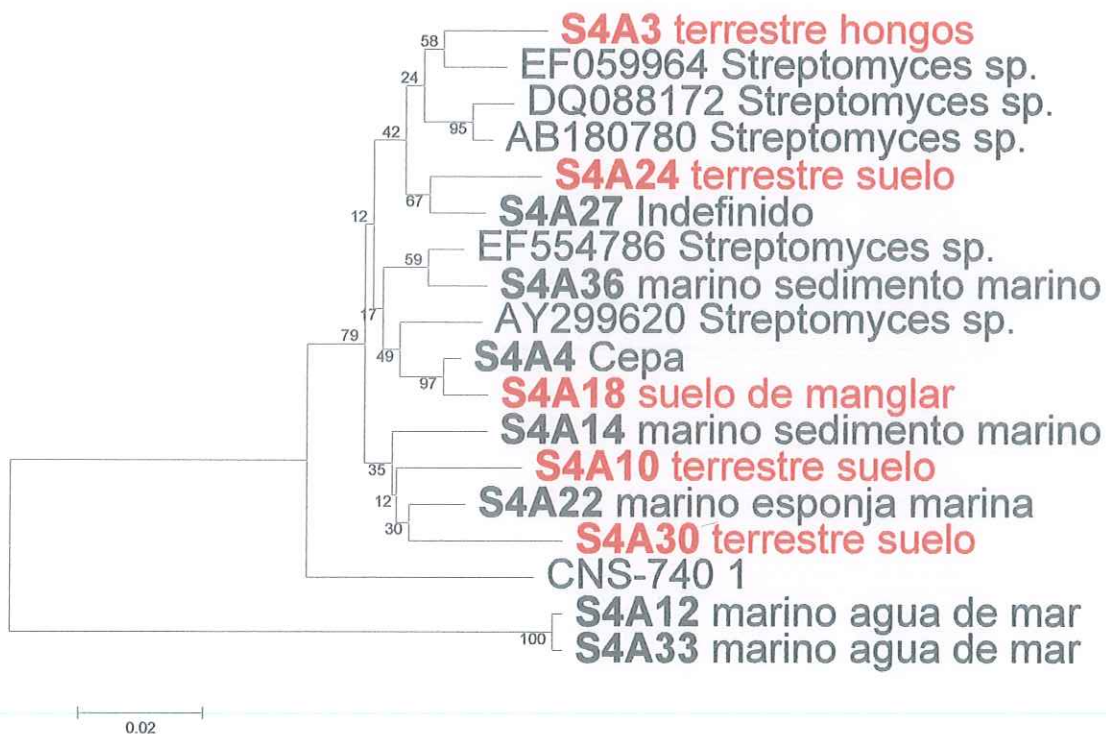


Figura 10. Comparación de clonas con similitud a vecinos marinos y terrestres con taxa de clonas secuenciadas utilizando cebadores específicos de *Streptomyces* Sm6F y Sm5R en muestras marinas. La historia evolutiva fue evaluada usando el método de "Neighbor-Joining" (Rusch et al., 1987). Con un total de 579 bases nucleotídicas, el análisis filogenético fue producido por MEGA4 (Tamura et al., 2007).

Índice de Shannon y Simpson en *Streptomycetaceae*

En la tabla 18 se encuentra el patrón de datos necesarios para el cálculo de los índices de Shannon y Simpson, el número de acceso de los vecinos filogenéticos más cercanos y el nombre de las clonas.

Tabla 18. Valores de n y N para el cálculo de D, en el índice de Shannon y Simpson para las clonas similares al género *Streptomyces*.

Clonas	Número acceso	Número (n)	n(n-1)
S4A3, S4A8, S4A21, S4A28, S4A31, S4A32	AF345862	6	30
S4A4, S4A5	AB249917	2	2
S4A6	EU477237	1	0
S4A7, S4A30	AB180761	2	2
S4A9, S4A10, S4A26	AB373970	3	12
S4A12, S4A33	DQ395912	2	2
S4A14	EU214914	1	0
S4A15	DQ026655	1	0
S4A16	AB184665	1	0
S4A18	EF012136	1	0
S4A22	DQ144233	1	0
S4A23	AJ518307	1	0
S4A24	EU119192	1	0
S4A25	EU544236	1	0
S4A27	EU216596	1	0
S4A35	AF421762	1	0
S4A36	EU099411	1	0
S4A37	EU073782	1	0
S4A38	EF562578	1	0
Total (N)		29	
$\Sigma n(n-1)$			48

$$D = \frac{48}{29(28)}$$

$$D = \frac{48}{812}$$

$$D = 0.05911$$

Los valores de los índices obtenidos que se muestran en la tabla 19, nos habla de una diversidad muy similar a la calculada con los cebadores generales, a pesar de sólo haber utilizado 29 clonas, la diversidad obtenida es considerada como alta, ya que el valor de "D" tiende a "0".

Tabla 19. Índices de Shannon y Simpson para las clonas secuenciadas con los cebadores específicos de la familia *Streptomycetaceae* Sm6F y Sm5R en muestras marinas.

Abundancia total	Índice de Shannon (H)	Índice de Simpson (D)
48	1.038	0.059

Diversidad de *Micromonospora* en sedimentos marinos

Aunque para la muestra SD06-09-4A se utilizaron los cebadores generales y los cebadores específicos de familia, éstos no dieron los mismos resultados, a través de este estudio. Para el género de *Micromonospora* hubo una dificultad muy consistente en la obtención de los productos de PCR y también se obtuvo una eficiencia de clonación baja.

Al emplear las enzimas de restricción, se observaron múltiples bandas, sugiriendo que los cebadores no son tan específicos, esta situación incrementó aún más la dificultad en la selección de clonas con el tamaño correcto (536 bp). Solamente el 31% de las secuencias analizadas corresponden a miembros de la familia *Micromonosporaceae*, de ninguna manera, esta baja eficiencia puede ser explicada por errores durante el almacenamiento de las muestras o la

extracción del ADN, ya que el ADN de los miembros de *Streptomyces* fueron fácilmente amplificados y clonados en las mismas muestras, esta dificultad en obtener una amplificación exitosa, ha sido reportada previamente por Fox et al., (1992) y por Maldonado et al., (2005).

Como hubo una baja eficiencia en la obtención de clonas para la muestra SD06-09-4A, fue necesario incluir otras muestras colectadas de sedimentos marinos pero de diferentes locaciones, como se describe previamente en la metodología.

Tabla 20. Información sobre vecinos más cercanos con las clonas secuenciadas utilizando cebadores específicos de *Micromonospora* en muestras marinas.

Clonas	Número de acceso	Vecino filogenético más cercano	% de Identidad	Fuente
M1A, M62A4, M44A1, M61A1b, M61A2b, M61A4b	AY464535	<i>Salinispora sp.</i>	99.49	Sedimento marino
M1C	AF237815	<i>Actinosingapura polymorpha</i>	94.31	Suelo
M3A, M61A3, M63B1, M63B3	DQ224165	<i>Salinispora pacifica</i>	97.5	Sedimento Marino
M62A5	DQ224164	<i>Salinispora arenicola</i>	99.34	Sedimento Marino
MM2A1, MM2A3, M2A7, M2A9, M2A10, M62A5b	X93197	<i>Catellatospora citrea</i>	97.83	Suelo
MM2A4	DQ008604	<i>Micromonospora sp.</i>	99.81	Suelo
MM2A5	AY569009	<i>Micromonospora aurantiaca</i>	99.63	Corazón humano
M2A1, M2A8	AB074671	<i>Actinobacterium clone</i>	100	Sedimento de Lago
M2A2	AY360157	<i>Micromonospora sp.</i>	98.19	Ambiente marino
M2A4, M2A6	AB200232	<i>Catellatospora coxensis</i>	99.1	Suelo
M62A1b	AB200231	<i>Catellatospora chokoriensis</i>	98.73	Suelo
M63A1, M63A2	AY040617	<i>Salinispora tropica</i>	98.09	Sedimento marino

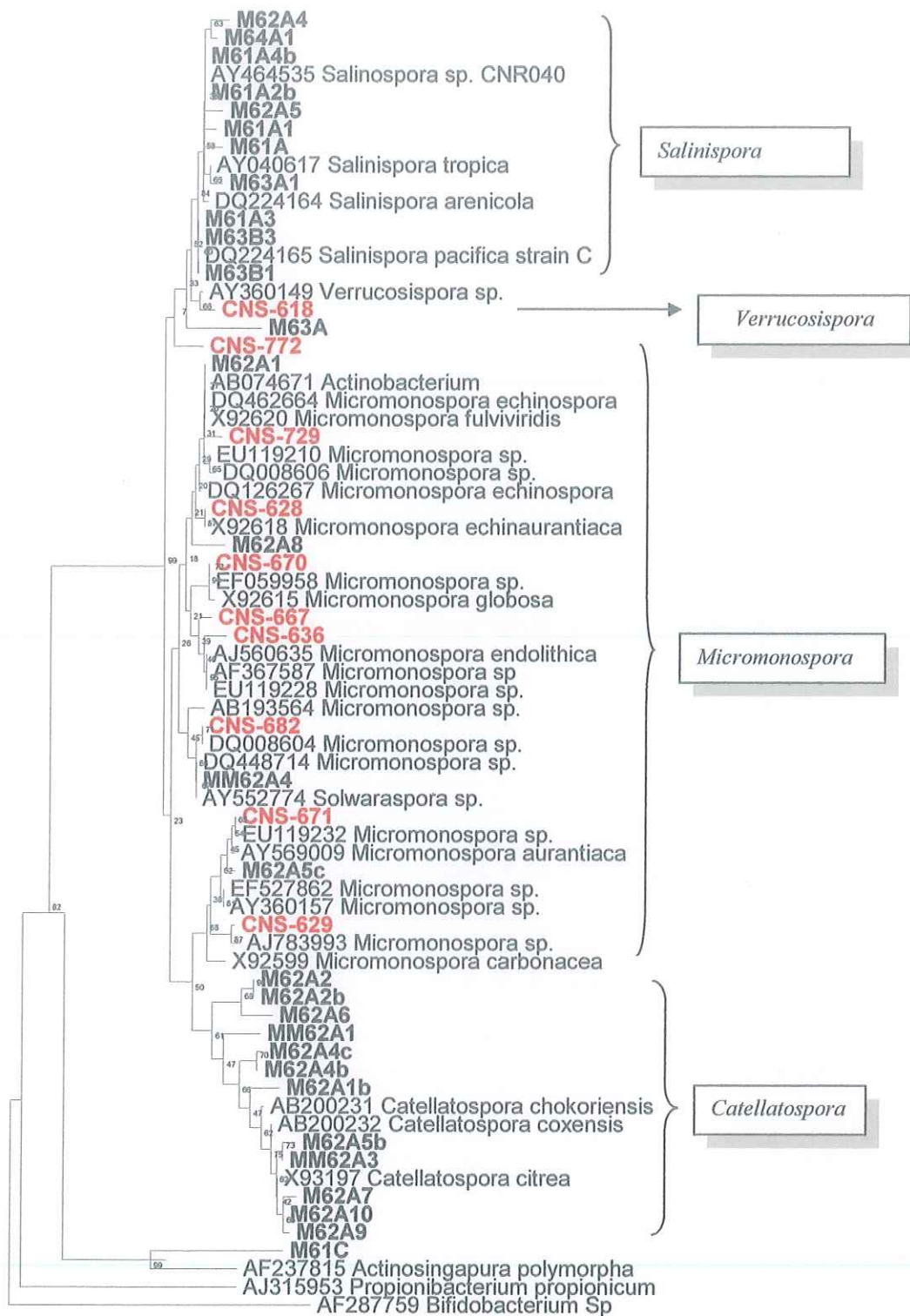


Figura 11. Relación evolutiva de 63 taxa con clonas secuenciadas utilizando cebadores específicos de *Micromonospora* M2F y A4R en muestras marinas. Con un total de 534 bases nucleotídicas, el análisis filogenético fue producido por MEGA4 (Tamura et al., 2007). Las cepas cultivadas se refieren a las muestras con prefijos CNQ y CNS (Prieto-Davo et al., 2008) y las clonas con prefijo M.

En la figura 11, se muestra el árbol filogenético construido con base en el uso de cebadores específicos de la familia *Micromonosporaceae*, las clonas obtenidas nos llevaron al descubrimiento de un tercer grupo de actinomicetos fuertemente relacionado a esta familia, el grupo *Catellatospora*, el cual no ha sido reportado anteriormente en sedimentos marinos.

DISCUSIÓN

En los últimos años, los sedimentos marinos se convirtieron en un recurso importante para el descubrimiento y aislamiento de nuevas actinobacterias, existiendo una probabilidad alta, de que algunos de estos microorganismos podrían ser productores de metabolitos secundarios interesantes para la biotecnología (Goh et al., 2002).

Junto con la amplia diversidad de productos naturales bioactivos que han sido aislados de las actinobacterias, el entendimiento de la diversidad de estos microorganismos ha probado ser extremadamente útil, tanto desde el punto de vista científico como el económico (Fenical y Jensen, 2006).

Varios investigadores afirman que entendiendo como los microorganismos productores de metabolitos secundarios se relacionan entre si, como se distribuyen en el planeta, que papel ecológico tienen en su hábitat, sería posible descubrir una diversidad enorme de compuestos químicos útiles para la humanidad, como en este caso las actinobacterias. Tomando en cuenta, que si dos organismos diferentes presentan un genoma muy similar, se esperaría una producción de compuestos químicos muy similar entre ellos, esto nos lleva a los estudios de diversidad, conociendo la diversidad total presente en un ambiente específico, se podría predecir qué tipo de compuestos químicos están presentes, lo que conlleva a entender la importancia de la diversidad ecológica en cada ambiente, dando como resultado una explotación de

recursos más específica y con más probabilidades de obtener resultados positivos en lo que se refiere la búsqueda de metabolitos secundarios.

Para un estudio de diversidad utilizando estudios de diversidad microbiana no dependientes de cultivo, se ha demostrado que las secuencias de ARNr observadas, generalmente representan la mayor parte de los microorganismos presentes en muestras ambientales (90 a 99.9%) (Harper et al., 2001). Por ejemplo, recientes estudios enfocados en la diversidad en ambientes marinos, demostraron la presencia de grupos distintos de actinomicetos que todavía no han sido cultivados (Rusch et al., 1987), cuyos resultados muestran una relación filogenética distante a actinomicetos tradicionalmente cultivados, los cuales podrían ser una fuente de productos naturales novedosos.

Es por eso que este capítulo sugiere, el uso de estudios de diversidad microbiana no dependientes de cultivo y diseño de cebadores generales y específicos de familia como estudios preliminares para la búsqueda de productos naturales, con el fin de desarrollar con una mejor precisión los métodos en donde se cultivan microorganismos provenientes de muestras ambientales y sólo se utilizan medios generales de cultivo.

Como es el caso del capítulo 1 de este proyecto, donde se utilizó agar marino para el aislamiento de bacterias presentes en la superficie de algas marinas, donde se obtuvo una diversidad mínima, aunque se encontraron metabolitos secundarios bioactivos, las bacterias que se cultivaron tenían características similares en cuanto a la utilización de la misma fuente de

carbono, o utilización de nutrientes y temperatura óptima, pero en cambio las bacterias que no compartían esta similitud no crecieron, aunque estaban presentes, no pudieron desarrollarse por falta de alguna condición vital como la degradación de algún nutriente o vitamina, lo que produce una disminución de diversidad, disminuyendo la probabilidad del descubrimiento de productos químicos interesantes.

Diversidad de Actinobacterias en sedimentos marinos

El 100% de las clonas secuenciadas mostraron una similitud constante con otras clonas de bacterias no cultivables obtenidas en otros estudios, la mayoría fue similar a las clonas del trabajo que realizaron Heijs et al., (2007), en donde determinaron la diversidad de Bacteria y *Archaea* presentes en sedimentos ricos en metano, provenientes del volcán Kazán en el este del mar Mediterráneo.

Un aspecto interesante, es que aunque los cebadores generales que se utilizaron fueron diseñados para amplificar actinomicetos (actinobacterias con micelio), el árbol muestra que las clonas amplificadas tienen una tendencia hacia otros géneros de bacterias y actinobacterias, y no exclusivamente hacia los actinomicetales, esta conducta puede explicarse de manera lógica, pues es posible que exista una abundancia enorme de bacterias de las diferentes familias y también actinobacterias, en comparación con los actinomicetales presentes en la muestra, por probabilidad es lógico obtener secuencias de bacterias que están presentes en cantidades enormes, que obtener secuencias

de bacterias en cantidades mínimas, ya que el diseño de los cebadores se realizó con el fin de obtener una amplia diversidad de organismos presentes en una muestra ambiental, es por eso que se recurrió al diseño de los cebadores específicos de familia (*Streptomycetaceae* y *Micromonosporaceae*), ya que al realizar los estudios dependientes de cultivo en las muestras de sedimento marino de este proyecto, se encontró la presencia de estas dos familias utilizando métodos tradicionales de cultivo (Prieto-Davo et al., 2008).

Índices de Diversidad de Shannon y Simpson para actinomicetos y *Streptomyces*

Al analizar los índices de diversidad, sabiendo que el índice de Simpson nos habla que entre menor sea el valor de "D" mayor es la diversidad, en este caso, el valor de "D" se inclinó al valor de "0", lo que nos muestra que utilizando 40 clonas, la diversidad que se obtiene es grande con ambos pares de cebadores (Tabla 10), seguramente la diversidad aumentaría si incrementáramos el número de clonas en el estudio. Esto fue demostrado por Prieto-Davo et al (2008), donde utilizaron estimadores de diversidad no paramétricos calculados por el software EstimateS (Version 7, Colwell, 2004, <http://www.purl.oclc.org/estimates>) y el programa UniFrac (<http://www.bmf2.colorado.edu/unifrac/index.psp>) que sirvieron para evaluar la diversidad filogenética de 111 secuencias de bacterias obtenidas cerca de la costa de San Diego, Ca. Los resultados obtenidos muestran que al utilizar los

estimadores de abundancia Chao 1, ACE, y Jackknife 1, la diversidad se incrementa cuando se incrementan el número de clonas en el estudio.

Tabla 21. Índices de Shannon y Simpson para las familias de *Actinomicetos* y *Streptomicetos*.

Cebadores de familia	Índice de Shannon (H)	Índice de Simpson(D)
<i>Actinomicetos</i> (Act235 y Act878)	1.005	0.051
<i>Streptomicetos</i> (Sm6F y Sm5R)	1.038	0.059

En la tabla 21, se puede apreciar que los valores del índice de diversidad de Shannon y Simpson resultante de las clonas de los dos pares de cebadores, son valores muy parecidos esto quiere decir que, en una misma muestra la diversidad de especies no varía de forma importante, aunque se empleen diferentes pares de cebadores para determinarla.

El índice de Shannon (H) fue obtenido mediante el uso de la página de internet (Kulvac, 1968, www.changbioscience.com/genetics/shannon.html). El índice "H" aumenta a medida que aumenta la riqueza (el número de especies en la muestra) y los individuos se distribuyen más homogéneamente entre todas las especies. Por lo tanto, la diversidad es cero cuando sólo se tiene una especie y, cuando hay 2 o más especies, es máxima si todas las especies tienen el mismo número de individuos (es decir, cuando las proporciones de todas las especies son iguales, $p_1 = p_2 = \dots = p_s$). Es evidente que dos muestras pueden tener el mismo H con diferentes combinaciones de riquezas y

abundancias relativas. Existen estadísticos que permiten probar hipótesis sobre las diferencias de diversidad de dos o más colecciones (Kulvac, 1968). El valor de "H" se ha calculado en muchos estudios ecológicos, los cuales muestran que "H" generalmente varía entre 1.5 y 3.5 y que raramente pasa de 4.5 (Magurran, 1988). Por lo tanto, los valores de los índices nos muestran que al utilizar los cebadores generales para actinomicetos, se obtuvo más diversidad que utilizando los cebadores específicos para *Streptomyces*, ya que el valor de "D" es menor, sin embargo, al analizar los valores de "H", se observa que las clonas encontradas con los cebadores específicos están distribuidas más homogéneamente en la muestra.

Diversidad de *Streptomyces* en sedimentos marinos

En la figura 3 se presenta el árbol filogenético construido con base en las clonas de *Streptomyces* utilizando cebadores específicos de ésta familia, estas clonas están representadas con el prefijo "S64A". También se colocaron en el árbol las cepas que se obtuvieron utilizando los métodos de diversidad dependientes de cultivo, en las cuales se utilizó el mismo par de cebadores para su identificación molecular (Prieto-Davo et al., 2008). Al combinar los resultados 23 clonas de *Streptomyces* (Método de diversidad no dependiente de cultivo) y 16 cepas cultivables (método de diversidad dependiente de cultivo) (Prieto-Davo et al., 2008) seleccionadas para construir el árbol, solo una clona se alinea con una cepa cultivable, esto sugiere que la diversidad presente en el sedimento marino no puede ser representada completamente por ninguna de

las dos metodologías, ya que, si esto sucediera, todas las cepas cultivables tendrían su clona homóloga que las representara.

Con un total de 572 bases nucleotídicas, el árbol muestra agrupaciones de clonas que poseen un porcentaje de similitud bajo de 97.46% con otros *Streptomyces* (Grupo 1), agrupaciones de clonas que muestran un porcentaje de similitud de 98.73% (Grupo 2), agrupaciones de clonas con 97.79% con otros organismos (Grupo 3), así mismo se obtuvieron agrupaciones de clonas que no mostraron representantes del género actinomicetales (este grupo da evidencia que los cebadores no son completamente específicos para el género *Streptomyces*, sino que se puede amplificar material genético perteneciente a otras especies) (Grupo 4). Se puede sugerir que los tres primeros son especies nuevas marinas ya que el porcentaje de identidad que poseen es baja (98% o menos), sin embargo, aunque en algunos de ellos, los vecinos filogenéticos más cercanos se hayan extraído anteriormente de muestras terrestres, las clonas que conforman estos grupos fueron extraídos de sedimentos marinos a una profundidad de 1200 m, lo que comprueba la capacidad de estos organismos para sobrevivir a bajas temperaturas, tolerar altas concentraciones de sales y para tolerar la presión atmosférica a esas profundidades, por lo que con base en estas condiciones de la muestra y al bajo porcentaje de identidad con otros organismos, se sugieren que las clonas pertenecientes a los grupos 1 al 3 (Grupo 1: S64A32, S64A3, S64A31, S64A21, S64A8. Grupo 2: S64A9, S64A10, S64A26. Grupo 3: S64A7, S64A30) son especies marinas nuevas no cultivables relacionadas a la familia *Streptomycetaceae*.

Investigaciones realizadas por Moran et al., (1995), afirmaron que utilizando la técnica del 16S ARNr con cebadores específicos del género *Streptomyces*, lograron determinar que algunas poblaciones de *Streptomyces* son organismos nativos de las comunidades bacterianas en los sedimentos marinos.

En el pasado se realizaron debates argumentando que los *Streptomyces* marinos que han sido aislados, provienen de poblaciones que no residen en los océanos, sino que provienen de esporas de especies terrestres, las cuales se han transportado físicamente a los ecosistemas marinos. Moran et al., (1995) controlaron rigurosamente la extracción del ARNr, indicando que del 2 al 5% de la comunidad bacteriana en sedimentos pertenecían a los *Streptomyces* y que las esporas no eran la fuente de las señales que se producían en la hibridización. La población de *Streptomyces* conserva la posición 26 en lo que respecta a las especies más abundantes en sedimentos.

Diversidad de *Micromonospora* en sedimentos marinos

A pesar del escaso número de clonas analizados, los resultados obtenidos durante este estudio llegaron a ser interesantes como un estudio preliminar para la diversidad de esta familia de actinomicetos en sedimentos marinos colectados en las Costas de San Diego. Al combinar los resultados, las clonas y las cepas aisladas cultivadas (Prieto-Davo et al., 2008), los datos revelaron una amplia diversidad con los miembros de la familia

Micromonosporaceae presentes en muestras de sedimentos marinos en San Diego.

En estos resultados, no se observaron filotipos nuevos, pero los métodos de diversidad no dependientes de cultivo fueron capaces de detectar secuencias relacionadas a dos géneros, las cuales no fue posible cultivar, incluyendo el género marino *Salinispora*. Un punto interesante de resaltar es que a pesar de que en el estudio dependiente de cultivo no se aislaron colonias de *Salinispora*, el 40% de las clonas (incluyendo 3 OTUs) mostraron una alta homología en las secuencias (> 99 %) de los miembros de este género, como se muestra en la tabla 9.

Para el género *Catellatospora* no se han realizado aún estudios que determinen si este grupo es productor de metabolitos secundarios bioactivos. Estas actinobacterias provienen de la familia *Actinoplanetes* comparten un porcentaje de similitud muy alto con el grupo *Micromonospora*, cuyos miembros han demostrado ser productores de una gran diversidad de metabolitos secundarios bioactivos, como son los MAR 2 (Kalaitzis et al., 2003) y MAR 4 (Fuhrman y Azam, 1980).

Soria-Mercado et al., (2005), reportaron el aislamiento y elucidación estructural de 5 análogos de la nampiradiomicina, incluyendo 3 estructuras nuevas, provenientes de la cepa CNQ-525 perteneciente al grupo de los MAR4. Esta cepa fue aislada de sedimentos de la costa de San Diego, Ca., a una profundidad de 160 m y es productora de cloro-dihidroquinonas mostrando significativa actividad antibiótica de 1.90-3.90 $\mu\text{M mL}^{-1}$ (MRSA contra

Staphylococcus aureus) y actividad anticancerígena de 0.97-2.40 $\mu\text{M mL}^{-1}$ contra células de cáncer colorectal HCT-116 (Soria-Mercado et al., 2005).

Los MAR2, son un grupo muy relacionado al género *Marinispora*, los cuales también fueron aislados de la costa de San Diego, Ca., se encontró que son productores de un potente compuesto antitumoral y antibiótico conocido como marinomicina, cuya actividad se refleja en algunos tumores humanos y bacterias patógenas resistentes. Los ensayos desarrollados en el US National Cancer Institute mostraron que marinomicina A tiene actividad in vitro en contra de 6 a 8 líneas celulares de melanoma, con la línea celular K-MEL-5 muestra la sensibilidad más alta ($\text{LD}_{50} = 5.0 \text{ nM}$). Marinomicina A también inhibe el crecimiento de las bacterias patógenas con un valor de $\text{MIC} = 0.1 \mu\text{M}$ contra *Staphylococcus aureus* (MRSA) y *Enterococcus faecium* (VREF) (Kwon et al., 2006).

De ninguna manera, el uso de métodos de cultivo debe ser subestimado, ya que solamente utilizando este método tradicional el género *Verrucosipora* fue observado (Rheims et al., 1998). Estas observaciones claramente revelan la importancia de una investigación polifásica cuando se trata del estudio de la diversidad de microorganismos en sedimentos marinos.

En conclusión, es necesario el mejoramiento de los métodos para incrementar la integridad del ADN y mejorar la amplificación de los genes del miembro de la familia *Micromonosporaceae* por PCR. Estas bacterias garantizan un continuo estudio ya que parecen tener una abundancia relativa entre los actinomicetos, siendo también una fuente importante para obtener una

diversidad química de compuestos con actividad biológica (Bérdy, 2005; Feling et al., 2003; Moran et al., 1995).

CONCLUSIONES

1. Los estudios de diversidad dependientes y no dependientes de cultivo por separado, no pueden determinar completamente la diversidad presente en muestras de sedimentos marinos.
2. El 100% de las clonas secuenciadas mostraron una similitud constante con otras clonas de bacterias no cultivables de otros estudios reportados utilizando los cebadores generales de actinomicetos Act235 y Act878.
3. Los cebadores generales empleados para amplificar secuencias de actinomicetos, resultaron amplificadores de otras bacterias.
4. Los cebadores específicos de las familias *Streptomycetaceae* y *Micromonosporaceae* utilizados en este trabajo revelaron la presencia de ambas familias.
5. Los índices de Shannon y Simpson obtenidos empleando los cebadores Act235, Act878, Sm6F y Sm5R son muy parecidos por lo que la diversidad en especies no varía aunque se empleen cebadores generales y específicos de familia.

6. Se encontraron clonas con una similitud alta al género productor de metabolitos secundarios *Salinispora*.
7. En este trabajo se reporta por primera vez clonas de la especie de *Catellatospora sp.*, en muestras de sedimentos marinos.
8. Con un total de 572 bases nucleotídicas el árbol filogenético obtenido muestra la agrupación de 4 grupos de bacterias, uno de ellos no perteneciente del género actinomicetos indicando que los cebadores no fueron específicos para *Streptomyces*.
9. Se encontró una diversidad amplia de la familia de *Micromonosporaceae* en muestras de sedimentos marinos en la costa de San Diego, Ca.
10. El buen uso y diseño de cebadores es fundamental en estudios de diversidad, obteniendo resultados dependiendo de la especificidad de los cebadores.

LITERATURA CITADA

- ACKERMANN, G., Löffler, B., Adler, D. and A.C., Rodloff, 2004. In Vitro Activity of OPT-80 against *Clostridium difficile*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 48(6): 2280–2282.
- ALTSCHUL, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and D.J., Lipman, 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215: 403-10.
- AZAM, F., 2001. Introduction, history, and overview: the methods to our madness. *Marine Microbiology*. 1-12.
- BÉRDY, J., 2005. Bioactive Microbial Metabolites. *Journal of Antibiotics*. 58: 1- 26.
- BINTRIM, S. B., Donohue, T. J., Handelsman, J., Roberts, G. P. and R.M., Goodman, 1997. Molecular phylogeny of *Archaea* from soil. *Proceeding of Natural Academy of Sciences. USA*. 94: 277–282.
- BOWMAN, J. and R.D.M., Pa, 2003. Biodiversity, community structural shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 2463-83.
- BURDIGE, D.J., 2005. *Geochemistry of Marine Sediments*. Princeton University Press. 2: 5-24.
- BUTLER, M.S., 2008. Natural Products to Drugs: Natural products derived compounds in clinical trials. *Natural Products Report*. 25: 75-516.
- COLWELL, R.K., 2004. EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples.
- EUZÉBY, J.P., 1997. *List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a*

folder available on the Internet. International Journal Systematic Bacteriology. 47: 590-592.

FELING, R.H., Buchanan, G. O. Mincer, T. J., Kauffman, C. A., Jensen, P.R. and W., Fenical, 2003. Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinispora*. Chemistry International. 42: 255-7.

FENICAL, W. and P.R., Jensen, 2006. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. Nature 2: 666-73.

FOX, G.E., Wisotzkey, J.D. and J.P., Jurtshuk, 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. International Journal of Systematic Bacteriology. 42: 166-70.

FUHRMAN, J.A. and F., Azam, 1980. Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia, Antarctica and California. Applied and Environmental Microbiology. 39: 1085-95.

GOH, E.B., Yim, G., Tsui, W., McClure, J.A., Surette, M.G. and J., Davies, 2002. Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. Proceedings of the National Academy of Sciences. 99: 17025-30.

GOODFELLOW, M., Williams, S.T. and M., Mordarski, 1988. Actinomycetes in Biotechnology. London: Academic Press.

GONTANG, E.A., Fenical, W. and P.R., Jensen, 2007. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. Applied and environmental microbiology. 73: 3273-82.

GREIG-SMITH, P., 1983. Quantitative plant ecology. 3 ed., University of California Press, Berkeley, California, USA. pp.163-164.

HARPER, M.K., Copp, B.R., James, R.D., Lindsay, B. S. and A.D., Richardson, 2001. Introduction to the chemical ecology of marine natural products. Marine Chemical Ecology. 3-29.

HEIJS, S.K., Haese, R.R., Van der Wielen, P.W., Forney, L.J. and J.D., Van Elsas, 2007. Use of 16S rRNA Gene Based Clone Libraries to Assess Microbial Communities Potentially Involved in Anaerobic Methane Oxidation in a Mediterranean Cold Seep. Microbiological Ecology. 53 (3): 384-398.

<http://www.bmf2.colorado.edu/unifrac/index.psp>.

<http://www.changbioscience.com/genetics/shannon.html>.

<http://www.purl.oclc.org/estimates>.

HUGENHOLTZ, P., Pitulle, C., Hershberger, K. L. and N.R., Pace, 1998. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. Journal of Bacteriology, 180: 366–376.

JENSEN, P.R. and C., Mafna, 2006. Biogeography of the marine actinomycete *Salinispora*. Environmental Microbiology. 8:1881-1888.

KALAITZIS, J.A., Hamano, Y., Nilsen, G. and B.R., Moore, 2003. Biosynthesis and structural revision of neomarinone. Organic Letters. 5: 4449-52.

KULVAC, S., 1968. Information theory and statistics. Dover, New York, USA.

KWON, H.C., Kauffman, C.A., Jensen, P.R. and W., Fenical, 2006. Marinomycins A-D, antitumor antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of

the recently discovered genus "*Marinispora*". Journal of American Chemistry Society. 128: 1622–1632.

- MAGURRAN, A., 1988. Diversidad Ecológica y su Medición. Ediciones Vedra S.A.
- MALDONADO, L.A., Stach, J. E. M., Pathom-aree, W., Ward, A. C., Bull, A. T. and M., Goodfellow, 2005. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie Van Leeuwenhoek* 87: 11-8.
- MORAN, M.M., Rutherford, L.T. and R.E., Hudson, 1995. Evidence for indigenous *Streptomyces* in a marine environment determined with a 16S rRNA probe. *Applied and environmental microbiology*. 61: 3695-700.
- MUNN, C.B., 2004. Marine Microbiology: Ecology and Applications. Advanced. 1, 2.
- NIVEN, D.F. and R.A., MacLeod, 1980. Sodium ion-substrate symport in a marine bacterium. *Journal of Bacteriology*. 142: 603-7.
- PRIETO-DAVÓ, A., Fenical, W. and P.R., Jensen, 2008. Comparative actinomycete diversity in marine sediments. *Aquatic Microbial Ecology*. 52: 1–11.
- RAPPÉ, M.S., Connon, S. A., Vergin, K. L. and S.J., Giovannoni, 2002. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature*. 418: 630-3.
- RHEIMS, H., Schumann, P., Rohde, M. and E., Stackebrandt, 1998. *Verrucosipora gifhornensis* gen. nov., sp. nov., a new member of the actinobacterial family *Micromonosporaceae*. *International Journal Systematic Bacteriology*. 48: 1119-1127.
- RUSCH, D.B., Halpern, A.L., Sutton, G., Heidelberg, K.B., Williamson, S., Yooseph, S., Wu, D., Eisen, J.A., Hoffman, J.M., Remington, K., Beeson, K., Tran, B., Smith, H., Baden-Tillson, H., Stewart, C., Thorpe, J., Freeman, J., Andrews-

- Pfannkoch, C., V., Li K., Kravitz, S., Heidelberg, J.F., Utterback, T., Rogers, Y., Falcon, L.I., Saitou, N. and M., Nei, 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4:406-425.
- SCHAAL, K.P., Yassin, A.F. and S., Erko, 2006. The Family Actinomycetaceae: The Genera *Actinomyces*, *Actinobaculum*, *Arcanobacterium*, *Varibaculum*, and *Mobiluncus*. *Prokaryotes*. 3:430–537.
- SIMPSON, E.H., 1951. The Interpretation of Interaction in Contingency Tables. *Journal of the Royal Statistical Society*. 13: 238–241.
- STACH, J.E.M. and A.T., Bull, 2005. Estimating and comparing the diversity of marine actinobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 87: 3-9.
- STACKEBRANDT, E, Rainey, F.A. and N.L., Ward-Rainey, 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *International Journal Systematic Bacteriology*. 47:479-491.
- SORIA-MERCADO, I.E., Prieto-Davo, A., Jensen, P.R. and W., Fenical, 2005. Antibiotic terpenoid chloro-dihydroquinones from a new marine actinomycete. *Journal of Natural Products*. 68: 904-10.
- SORIANO, S.V., Brasili, S., Saiz, M., Carranza, C., Vidal, P., Calderon, J. and H.A., Lopardo, 2000. *Streptococcus pyogenes*: sensibilidad a penicilina y eritromicina en las ciudades de Neuquen y Cipolletti. *Medicina*. 60: 487-490.
- STALEY, J. and A.K., Ta, 1985. Measurement of *in situ* activities of Nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Reviews in Microbiology*. 39: 321-46.

- SCHLOSS, P. and J.H., Da, 2004. Status of the microbial census. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68: 686-91.
- TAMURA, K., Dudley, J., Nei, M. and S., Kumar, 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*.
- WAKSMAN, S. A. and H.B., Woodruff, 1940. The soil as a source of microorganisms antagonistic to diseaseproducing bacteria. *Journal of Bacteriology*. 40: 581–600
- XU, L., Li, Q. and C., Jiang, 1996. Diversity of actinomycetes in Yunnan, China. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 244-8.

CONCLUSION GENERAL

El estudiar en conjunto los métodos independientes de cultivo y el diseño adecuado de cebadores garantiza que los resultados nos guíen a un mejor diseño de investigación. Los métodos tradicionales de cultivo no deben ser considerados inapropiados para los estudios de diversidad y búsqueda de nuevas sustancias bioactivas. Ya que al conocer previamente la diversidad microbiana presente en determinado tipo de muestra, el investigador puede deducir que tipo de compuestos químicos podrían estar presentes en la muestra, y no invertir tiempo en estudios donde las muestras contienen diversidad previamente reportadas, sino enfocarse a microorganismos nuevos, o microorganismos relacionados fuertemente a otros que son productores de sustancias bioactivas.