



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



**Aislamiento, identificación molecular y
bioactividad de bacterias Gram positivas
asociadas a la esponja *Aplysina clathrata*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS MARINAS
EN
MANEJO DE RECURSOS MARINOS

P R E S E N T A

CYNTHIA ITZEL MONTES PLASCENCIA

LA PAZ, B. C. S. NOVIEMBRE DEL 2013



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 14 del mes de Noviembre del 2013 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

**"AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y BIOACTIVIDAD
DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS ASOCIADAS A LA ESPONJA *Aplysina clathrata*"**

Presentada por el alumno:

MONTES Apellido paterno	PLASCENCIA materno	CYNTHIA ITZEL nombre(s)							
		Con registro: <table border="1"> <tr> <td>B</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>3</td> <td>0</td> <td>6</td> </tr> </table>	B	1	1	0	3	0	6
B	1	1	0	3	0	6			

Aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

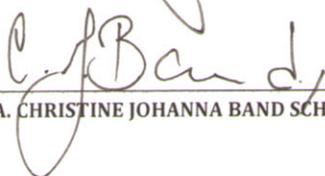
Directores de Tesis


DRA. CLAUDIA JUDITH HERNÁNDEZ GUERRERO
Directora de Tesis

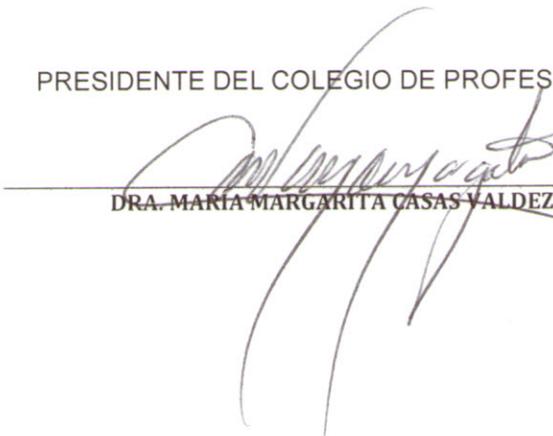

DRA. BÁRBARA GONZÁLEZ ACOSTA
2ª. Directora de Tesis


DR. ALBERTO SÁNCHEZ GONZÁLEZ


DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ


DRA. CHRISTINE JOHANNA BAND SCHMIDT

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


DRA. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ



IPN
CICIMAR
DIRECCION



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 25 del mes Noviembre del año 2013
el (la) que suscribe BIÓL. CYNTHIA ITZEL MONTES PLASCENCIA alumno(a) del
Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS
con número de registro B110306 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS
manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:
DRA. CLAUDIA JUDITH HERNÁNDEZ GUERRERO Y DRA. BÁRBARA GONZÁLEZ ACOSTA
y cede los derechos del trabajo titulado:

"AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y BIOACTIVIDAD

DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS ASOCIADAS A LA ESPONJA *Aplysina clathrata*"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: lunax 35@hotmail.com - cguerrer@ipn.mx - bgonzal@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

BIÓL. CYNTHIA ITZEL MONTES PLASCENCIA

nombre y firma

DEDICATORIA

Les dedico esta tesis a ustedes, mis superhéroes favoritos (también conocidos como mis padres), porque me protegen, me cuidan y cuando me equivoco me ayudan, cuando dudo me aconsejan y siempre que les llamo están a mi lado. Las palabras nunca me van a bastar para agradecerles todo lo que han hecho por mí y lo mucho que los amo.

A ti Memo que siempre me estas animando, me escuchas aún cuando digo disparates o cosas que los demás no entenderían. En el camino que nos queda por recorrer, me hace feliz saber que siempre vas a estar a mi lado. Gracias.

A mi Tita, mi Tete y Adri... aunque nos llevamos algunos años de diferencia (otros más, otros menos) el amor y cariño que siento por ustedes no merma ni un poquito.

A mis tías, viejos amigos y a quienes recién se sumaron a mi vida para hacerme compañía y brindarme su cariño y apoyo incondicional.

A mi roomie, algún día trilliza, iremos a buscar al oso polar y al esquimal que nos dejaron a nuestra suerte y de paso espero, logremos cumplir con todos esos viajes de los que tanto hablamos. A mi otro trillizo, Pato te echo mucho de menos pero siempre estás en mis pensamientos. ¡Los quiero mucho trillizos de tres!

A mis directoras que admiro y respeto mucho, Claudia y Dra. Bárbara, sé que no siempre fue sencillo y sin embargo siempre me tuvieron paciencia y confianza para trabajar con ustedes. Las quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional y al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas por haberme brindado la posibilidad de realizar este posgrado.

A CONACyT, por el apoyo económico otorgado durante mis estudios (420805).

A mis directoras de tesis Dra. Claudia Hernández Guerrero y Dra. Bárbara González Acosta, por su orientación, paciencia, apoyo y amistad que me permitieron aprender mucho más que lo estudiado en este proyecto.

A los miembros de mi comité revisor Dra. Christine Band Schmidt, Dr. Sergio Martínez Díaz y Dr. Alberto Sánchez González por su guía y atención durante la realización de este trabajo.

A José Borges y Alejandra Chávez por su ayuda en las recolectas del material biológico y por la grata convivencia en las salidas de campo.

Y por último pero no menos importante, a mis compañeros de laboratorio que gradualmente se fueron convirtiendo en mi familia: Sonia, Ismael, Noemí, Francisco, Karla, César, Erika, Diana, Lina, Lalo, Conchita, Wanda, Román y Lucy. El ambiente de trabajo que se creó con ustedes fue simplemente perfecto, su visión y motivación me ayudaron en momento críticos. Me considero muy afortunada de poder llamarlos amigos.

ÍNDICE

GLOSARIO	iii
ABREVIATURAS	v
INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 Esponjas y su microbiota asociada.....	5
2.2 Mecanismo de resistencia bacteriana.....	7
3. ANTECEDENTES.....	8
3.1 Diversidad filogenética de bacterias marinas Gram positivas.....	8
3.2 Compuestos bioactivos de bacterias Gram positivas.....	9
3.3 Estudios químicos de bacterias Gram positivas aisladas de esponjas.....	11
3.4 Aislamiento de bacterias Gram positivas de esponjas marinas.....	13
4. JUSTIFICACIÓN.....	15
5. HIPÓTESIS.....	16
6. OBJETIVOS.....	16
6.1 General.....	16
6.2 Particulares.....	16
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
7.1. Obtención del material biológico.....	17
7.2 Aislamiento y caracterización morfológica de las bacterias Gram positivas asociadas a <i>Aplysina clathrata</i>	18
7.2.1 Preparación de medios de cultivo.....	18
7.3. Identificación molecular de las bacterias asociadas a <i>A. clathrata</i>	19
7.3.1. Aislamiento de ADN.....	19

7.3.2. Amplificación de ADN mediante PCR.....	20
7.3.3 Secuenciación y análisis filogenético.....	21
7.4 Ensayo de actividad antimicrobiana.....	22
7.5 Prueba de hemólisis.....	22
8. RESULTADOS.....	23
8.1 Aislamiento y caracterización morfológica de las bacterias Gram positivas asociadas a <i>Aplysina clathrata</i>	23
8.2 Identificación molecular de las bacterias asociadas a <i>Aplysina clathrata</i> ..	26
8.3 Variación temporal de las bacterias asociadas a la esponja <i>Aplysina clathrata</i>	34
8.4 Ensayos de actividad antimicrobiana.....	39
8.5 Ensayos de actividad hemolítica.....	42
8.6 Variación estacional de la actividad antimicrobiana y hemolítica.....	43
9. DISCUSIÓN.....	46
9.1. Aislamiento y caracterización morfológica de las bacterias Gram positivas asociadas a <i>Aplysina clathrata</i>	46
9.2. Identificación de las bacterias Gram positivas asociadas a <i>Aplysina clathrata</i>	48
9.3. Variación estacional de las bacterias Gram positivas asociadas a la esponja <i>Aplysina clathrata</i>	51
9.4. Actividad antimicrobiana de las bacterias Gram positivas aisladas de <i>Aplysina clathrata</i>	52
10. CONCLUSIONES.....	55
11. LITERATURA CITADA.....	57
12. ANEXOS.....	68

GLOSARIO

Actividad biológica o bioactividad: efecto benéfico o adverso de una sustancia sobre un organismo vivo.

Alineamiento de secuencias: procedimiento bioinformático que sirve para representar y comparar dos o más secuencias o cadenas de ADN, ARN o proteínas, para resaltar su zona de similitud, que podrían indicar relaciones funcionales o evolutivas entre los genes o proteínas consultados.

Antibióticos: sustancia química producida por un ser vivo o derivada sintéticamente que mata o inhibe el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles.

Bioactivos: sustancias que tiene algún efecto sobre un organismo vivo, tejido o célula.

BLAST: por sus siglas en inglés *Basic Local Alignment Search Tool*. Es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN, ARN o de proteínas. El programa es capaz de comparar una secuencia problema (secuencia *query*) contra una gran cantidad de secuencias en una base de datos.

Bootstrap: método estadístico que puede estimar las distribuciones por creación repetida y análisis de conjuntos de datos artificiales.

Cepa: en microbiología, conjunto de virus, bacterias u hongos que poseen la misma composición genética.

Desnaturalización: proceso que por medio de altas temperaturas produce una separación de la doble hélice del ADN rompiendo los enlaces o puentes de hidrógeno durante la reacción en cadena de la polimerasa.

Electroforesis: técnica para la separación de moléculas según su movilidad en un campo eléctrico. Dependiendo de la técnica, la separación obedece en distinta medida a la carga eléctrica de las moléculas y a su masa.

Farmacología: ciencia que estudia el origen, las acciones y las propiedades que las sustancias químicas ejercen sobre los organismos vivos.

Genbank: base de datos de secuencias genéticas del NIH (National Institutes of Health de Estados Unidos), una colección de disponibilidad pública de secuencias de ADN.

Halo: zona alrededor de un disco o área impregnada con la sustancia activa en la que no se produce crecimiento bacteriano.

Homología: relación que existe entre dos partes orgánicas diferentes cuando sus determinantes genéticos tienen el mismo origen evolutivo.

Hospedero: organismo que alberga a otro en su interior o lo porta sobre sí.

Gram positiva: célula procariótica cuya pared celular está compuesta básicamente por peptidoglicano y que carece de membrana externa.

Gram negativa: célula procariótica cuya pared celular contiene relativamente poco peptidoglicano y presenta una membrana externa compuesta por lipopolisacárido, lipoproteína y otras macromoléculas complejas.

Metabolito secundario: compuesto orgánico sintetizado por el organismo que no tiene un rol directo en el crecimiento o reproducción del mismo, pero que pueden brindar ventaja competitiva.

Morfotipo: grupo de cepas bacterianas que son distinguibles de otras debido a las características morfológicas.

Oligonucleótido: secuencia corta de ADN o ARN, con cincuenta pares de bases o menos utilizados con diversos fines, uno de ellos como cebadores en reacciones de amplificación.

Secuenciación: conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un oligonucleótido de ADN.

Sonicación: aplicación de la energía del sonido para agitar las partículas de una muestra, con diversos fines científicos o industriales.

SYBR Gold: colorante de cianina que se utiliza para la tinción fluorescente de los ácidos nucleicos con una gran sensibilidad.

Taq polimerasa: enzima termoestable aislada de *Thermus aquaticus* (Taq), una bacteria que soporta altas temperaturas.

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNr	ácido desoxirribonucleico ribosomal
ARN	ácido ribonucleico
Buffer TE	buffer Tris-EDTA
CTAB	bromuro de hexadeciltrimetilamonio
dNTP's	desoxirribonucleótido trifosfato
LB	colorante de carga (del inglés loading buffer)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecilsulfato sódico
TBE	solución amortiguadora tris-ácido bórico-EDTA
TE	tris EDTA
TSA	agar soya tripticasa

ÍNDICE DE TABLAS

PAG.

Tabla 1. Compuestos obtenidos de bacterias Gram positivas aisladas de esponjas.....	11
Tabla 2. Composición de medios de cultivo empleados para el aislamiento de bacterias Gram positivas asociadas a <i>Aplysina clathrata</i>	18
Tabla 3. Comparación de las bacterias asociadas a la esponja <i>A. clathrata</i> en las diferentes épocas del año con secuencias reportadas en el NCBI.....	27
Tabla 4. Posición taxonómica de las bacterias aisladas de la esponja <i>A. clathrata</i>	33
Tabla 5. Frecuencia de bacterias por género en las diferentes épocas del año.....	35
Tabla 6. Especies de bacterias aisladas de <i>A. clathrata</i> en las diferentes épocas del año 2012.....	36
Tabla 7. Actividad antimicrobiana de las bacterias aisladas de <i>Aplysina clathrata</i>	40
Tabla 8. Actividad hemolítica de los extractos acuosos de las cepas aisladas de la esponja <i>A. clathrata</i> con un tiempo de incubación de 24 h.....	43

INDICE DE FIGURAS

PÁG.

Figura 1. Representación esquemática de una bacteriosponja típica.....	6
Figura 2. Área de recolecta de los ejemplares de <i>Aplysina clathrata</i>	17
Figura 3. Diferentes morfotipos de bacterias aisladas de la esponja <i>A. clathrata</i> en las diferentes épocas del año. A) Ap0210, B) Ap0215, C) Ap0913, D) Ap0216, E) Ap0505 y F) Ap0904.....	23
Figura 4. Variación estacional de las cepas aisladas de la esponja <i>Aplysina clathrata</i> en el ciclo anual 2012.....	24
Figura 5. Aislamiento de las diferentes bacterias de la esponja <i>A. clathrata</i> en los seis diferentes medios de cultivo empleados.....	25
Figura 6. Aislamiento de las diferentes cepas por época y medio de cultivo. M1= agar marino; M2= arginina; M3= asparagina; M4= agar marino/extracto de esponja; M5= arginina/extracto de esponja y M6= asparagina/extracto de esponja.....	25
Figura 7. Productos de PCR obtenidos a partir del ADN de las bacterias aisladas de <i>A. clathrata</i> , con los dos diferentes pares de oligonucleótidos empleados 27F y Act235. 1 – Marcador molecular, 2 – Ap0507, 3 – Ap1104, 4 – Ap0201, 5 – Ap0504, 6 – Ap0505, 7 – Ap0506, 8 – Ap0512, 9 – Ap0513 y 10 – Ap0904.....	26
Figura 8. Árbol filogenético elaborado a partir de los oligonucleótidos 27F, de las bacterias aisladas de la esponja <i>A. clathrata</i>	30
Figura 9. Árbol filogenético elaborado a partir de los oligonucleótidos Act235, de las bacterias aisladas de la esponja <i>A. clathrata</i>	31
Figura 10. Porcentaje de bacterias correspondientes a los dos phyla de bacterias Gram positivas aisladas de <i>A. clathrata</i>	32
Figura 11. Representación en porcentaje de los diferentes géneros de bacterias aisladas de la esponja <i>Aplysina clathrata</i>	33
Figura 12. Especies de bacterias aisladas de la esponja <i>Aplysina clathrata</i>	34
Figura 13. Representación del aislamiento de las bacterias por fila en las diferentes épocas del año.....	35

Figura 14 Árboles filogenéticos de las bacterias aisladas de la esponja <i>A. clathrata</i> y cepas de referencia en las diferentes épocas del año, con los dos diferentes pares de oligonucleótidos empleados 27F y Act23.....	38
Figura 15. Halos de inhibición de crecimiento a) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , b) <i>Escherichia coli</i> y c) <i>Staphylococcus aureus</i>	41
Figura 16. Actividad antifúngica de la cepa Ap0509 frente a <i>Candida albicans</i>	41
Figura 17. Actividad hemolítica de los extractos acuosos de las cepas aisladas de la esponja <i>A. clathrata</i> . a) Ap0510 y Ap0522, b) Ap0520, c) Ap0518 y Ap0519 y c) Ap0509 y Ap0517.....	42
Figura 18. Variación temporal del porcentaje de bacterias aisladas de <i>A. clathrata</i> con actividad antimicrobiana frente a las diferentes bacterias patógenas.....	44
Figura 19. Variación temporal de la actividad de las bacterias aisladas de <i>A. clathrata</i> con actividad antimicrobiana.....	44
Figura 20. Variación temporal de la actividad hemolítica de las bacterias aisladas de <i>A. clathrata</i>	45

RESUMEN

Las Bacterias Gram positivas, específicamente Actinobacterias y el Orden Bacillales, son un grupo de interés por la producción de compuestos secundarios bioactivos, que pueden ser utilizados como fuente de antibióticos. Sin embargo, se conoce poco acerca de la diversidad de estas bacterias cultivables asociadas a esponjas. Por lo que el objetivo de este trabajo fue caracterizar, identificar molecularmente y evaluar de manera estacional la actividad antibacteriana de bacterias Gram positivas asociadas a la esponja *Aplysina clathrata* del área de Punta Arena de la Ventana, B.C.S., durante un ciclo anual (2012). Partiendo de diluciones seriales del tejido macerado de la esponja y utilizando seis diferentes medios de cultivo, se aislaron un total de 103 cepas. Con un medio de cultivo adicionado con asparagina y extracto de esponja se obtuvo el mayor número de aislamientos (30%). Estacionalmente también se observaron diferencias, siendo en primavera cuando se aisló el mayor número de cepas (40) y en verano el menor (17). De las cepas aisladas, 41 fueron caracterizadas e identificadas y los resultados del análisis filogenético indicaron que el 56% de las bacterias pertenece al grupo de las Actinobacterias, siendo los géneros *Rhodococcus* y *Kocuria* los más representativos, seguidos de *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Janibacter*, *Ornithinimicrobium* y *Salinispora*. El otro 44% fue representado por el filo Firmicutes, siendo los géneros *Bacillus* y *Holobacillus* los únicos presentes. Los resultados de los ensayos de actividad biológica mostraron que el 32% de las cepas fueron activas. 33 cepas con actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* (5 cepas), *Escherichia coli* (1 cepa), *Pseudomonas aeruginosa* (27 cepas) y *Candida albicans* (1 cepa) con halos de inhibición de entre 7.8 a 25.7 mm, y once cepas con actividad hemolítica tipo α y β . Este estudio muestra el potencial de la esponja *A. clathrata* para el aislamiento de bacterias Gram positivas que pueden ser utilizadas con fines biotecnológicos.

Palabras clave: Actinomicetos, Actividad antimicrobiana, Aislamiento, Bacterias Gram positivas, Esponjas, Firmicutes.

ABSTRACT

Gram positive bacteria, specifically *Actinobacteria* and order *Bacillales* are a group of interest in the production of bioactive secondary compounds, and can be used as source of antibiotics. However, little is known about the diversity of cultivable bacteria associated with sponges. The aim of this study was to characterize, molecularly identify and evaluate the antimicrobial activity of Gram positive bacteria associated with *Aplysina clathrata* sponge from Punta Arena de la Ventana, B.C.S., seasonally during an annual cycle (2012). Serial dilutions of homogenizate tissue sponge was cultivated in six different culture media. A total of 103 strains were isolated. The greatest number of isolates (30%) was obtained from the culture medium with asparagine and sponge extract added. Seasonally also differed, the great isolates was in spring (40) and the minor in summer (17). Only 41 isolates were characterized and identified. Phylogenetic analysis showed that 56% of the bacteria are to the *Actinobacteria* group, being *Rhodococcus* y *Kocuria* the most representative genera, followed by *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Janibacter*, *Ornithinimicrobium* and *Salinispora*. The other 44% was represented by the Phyla *Firmicutes*, including only the genera *Bacillus* and *Holobacillus*. The results of antimicrobial and hemolytic activity showed that 32% of the strains were active. Thirty three strains exhibit antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* (5 strains), *Escherichia coli* (1 strain), *Pseudomonas aeruginosa* (27 strains) and *Candida albicans* (1 strain) with halos of inhibition between 7.8 to 25.7 mm. And eleven strains presents hemolytic activity type α and β . This study showed the potential of the sponge *A. clathrata* for isolation of Gram positive bacteria that can be used for biotechnological purposes

Key words: *Actinobacteria*, Antimicrobial activity, Gram positive bacteria, Isolation, Sponges, *Firmicutes*.

1. INTRODUCCIÓN

Las esponjas son consideradas como los metazoarios más primitivos existentes y además uno de los phylas de invertebrados con mayor éxito en los océanos. Se encuentran ampliamente distribuidas y adaptadas a hábitats que van desde aquellos con luz limitada, profundos, tropicales, subtropicales y templados (Hentschel *et al.*, 2006; Raczkowski, 2010). Siendo organismos sésiles y simples han desarrollado un poderoso mecanismo de defensa química contra depredadores y competidores, así como microorganismos patógenos (Thomas *et al.*, 2010). Por lo que son una rica fuente de compuestos naturales con estructuras únicas, las cuales presentan un amplio rango de actividades biológicas (De la Rosa *et al.*, 2003; Anand *et al.*, 2006; Blunt *et al.*, 2009). Sin embargo, hay evidencia de que muchos de estos metabolitos presentan una notable similitud con metabolitos microbianos, por lo que se especula que varios de estos compuestos pueden ser de origen bacteriano (Santos *et al.*, 2010). Está bien documentado que las esponjas muestran una relación constante con microorganismos asociados, los cuales pueden llegar a representar hasta el 50-60% de la biomasa de la esponja (Blunt *et al.*, 2003; Zeng *et al.*, 2013).

El alto porcentaje de bacterias cultivables con actividad antimicrobiana aisladas de esponjas marinas sugiere que estas representan un nicho ecológico que alberga una diversidad microbiana en gran medida desconocida, con un potencial metabólico que promete ser un recurso excelente para el descubrimiento de nuevos compuestos activos frente al número cada vez mayor de patógenos resistentes (León *et al.*, 2011).

Dentro de las bacterias de interés biotecnológico, se encuentran las bacterias Gram positivas que pueden ser separadas en dos grandes subdivisiones, las bacterias con alto contenido de G+C pertenecientes al phyla Actinobacteria y las bacterias con bajo contenido de G+C del phyla Firmicutes (Gontang *et al.*, 2007). En el ambiente marino, las bacterias Gram positivas han sido poco estudiadas con respecto a sus contrapartes, las bacterias Gram negativas, debido tal vez a que se han observado en menor abundancia. Sin embargo, este grupo de bacterias ha demostrado ser una valiosa fuente de metabolitos secundarios, siendo tal su importancia, que a partir de ellas se han aislado la mayoría de productos naturales

caracterizados a partir de bacterias (Murphy *et al.*, 2012). Estos compuestos, además de tener roles ecológicos, actúan también como inhibidores de enzimas, promotores de apoptosis y como agentes antifúngicos, antibacterianos, anti-inflamatorios, inmunosupresores y anticancerígenos (Faulkner *et al.*, 2000; Gontang, 2008; Raczkowski, 2010).

Las esponjas de la familia *Aplysinidae* albergan una alta diversidad microbiana que tiene un gran potencial para la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos (Hentschel *et al.*, 2001; Sacristán-Soriano *et al.*, 2011). La alta densidad y diversidad taxonómica de bacterias dentro del mesohilo de las esponjas de esta familia y en específico del género *Aplysina*, sugieren que este invertebrado marino proporciona un ambiente propicio para la producción de agentes antimicrobianos que le sirven como defensa (Hentschel *et al.*, 2001).

En el arrecife rocoso de Punta Arena de la Ventana, B.C.S., se presentan dos especies del género *Aplysina*: *gerardogreeni* y *clathrata*. A partir de *A. gerardogreeni* se aislaron cepas de bacterias pertenecientes a las α -proteobacterias y otras especies Gram-negativas, *Staphylococcus*, *Sporosarcina* (Cocos Gram-positivos) y varias especies del género *Bacillus* (Águila-Ramírez *et al.*, 2011). En el caso de *A. clathrata*, una especie recientemente identificada (Cruz-Barraza *et al.*, 2012) no se conoce acerca de las bacterias que pueden ser cultivadas y el único antecedente que se tiene es que los extractos orgánicos de la esponja presentan una mayor actividad antibacteriana que *A. gerardogreeni* (Gándara-Zamudio, 2011). Por lo que el objetivo de esta investigación es identificar al grupo de bacterias Gram positivas que pueden ser cultivadas a partir de *Aplysina clathrata*, su variación temporal y establecer si las cepas aisladas presentan una actividad biológica significativa con la finalidad de crear una colección de cepas Gram-positivas con potencial bioactivo.

2. MARCO TEÓRICO.

2.1. Esponjas y su microbiota asociada.

El phyla Porifera consiste en animales bentónicos que se encuentran en ambientes marinos, pero también los hay de agua dulce. En cuanto a biomasa, estos organismos llegan a predominar en los arrecifes coralinos tropicales, pero también se encuentran a zonas polares y de grandes profundidades, así como en lagos de agua dulce y arroyos. Un 85% de las 15000 especies descritas de esponjas pertenecen a la clase Demospongiae, mientras que el resto pertenece a las clases Hexactinellida y Calcarea (Hentschel *et al.*, 2006; Santos-Gandelman *et al.*, 2013).

En los ambientes marinos, estos invertebrados presentan una notable capacidad filtradora, y pueden llegar a filtrar hasta $24 \text{ m}^3 \text{ kg}^{-1}$ esponja día^{-1} . Durante este proceso, se llegan a incorporar un gran número de bacterias que de otra manera pueden ser encontradas diluidas en el agua de mar (Mehbub *et al.*, 2012). A pesar del hecho de que las esponjas se alimentan de microorganismos, existe un gran número de bacterias extracelulares que habitan el mesohilo de muchas Demospongias. A este tipo de esponjas también se les ha llamado “Bacteriosponjas” o “Esponjas con alta abundancia microbiana”. En ellas, la densidad bacteriana llega a alcanzar de 10^8 a 10^{10} bacterias por gramo de peso húmedo de la esponja, valor que excede al agua de mar hasta por 2 a 4 órdenes de magnitud (Hentschel *et al.*, 2006). En la figura 1 se puede observar una representación esquemática de una bacteriosponja típica. Donde en azul, se muestra canal del sistema acuífero. El agua de mar entra en el osculo pasa a través de las cámaras del coanocito y sale de la esponja a través de los canales exhalantes como se demuestra con las flechas rojas. Las células ameboides de la esponja (que se muestran en naranja) son las responsables de la fagocitosis y la digestión. El sombreado rojo en los alrededores de la esponja muestra las cianobacterias en las superficies expuestas a la luz. Los triángulos verdes representan la fracción de microorganismos que presumiblemente se transmiten verticalmente a través de las etapas reproductivas. Los círculos azules simbolizan la fracción de microorganismos que se absorben a partir del agua de mar. Una vez dentro del mesohilo, o bien son digeridos rápidamente y sirven como fuente

de alimento, o pueden formar parte de la microbiota específica de la esponja. Los símbolos verdes en forma de media luna representan a las bacterias del agua de mar, que probablemente pasan a través de la esponja sin ser procesadas (Hentschel *et al.*, 2006).

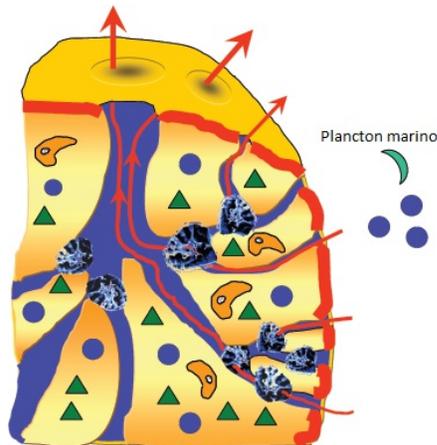


Figura 1. Representación esquemática de una bacteriosponja típica (Tomado de Hentschel *et al.* 2006, modificado al español).

Existen dos vías por las cuales posiblemente una esponja en desarrollo adquiere su microbiota simbiote. La primera es por absorción selectiva de microorganismos específicos que se encuentran en la columna de agua y que son adquiridos por la esponja durante la filtración. La segunda vía es por la transmisión vertical de estas bacterias a través de los gametos de la esponja por inclusión de estos microorganismos en los ovocitos o larvas (Radjasa *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2010).

Se han descubierto alrededor de 26 phylas de bacterias asociadas a esponjas (Lee *et al.*, 2011; Flemmer *et al.*, 2012; Zeng *et al.*, 2013). Siendo las principales Acidobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Cyanobacteria, Deinococcus-Thermus, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Nitrospira, Planctomycetes, Proteobacteria (Alpha, Beta, Delta, y Gammaproteobacteria), Spirochaetes, y Verrucomicrobia (Taylor *et al.*, 2007).

Las asociaciones bacteria-esponjas, que pueden ser categorizadas como mutualismo obligatorio donde los simbiotes juegan un papel importante en el metabolismo del hospedero; mutualismo facultativo, los simbiotes tienen un efecto benéfico en el hospedero pero este puede sobrevivir sin ellos; o comensalismo, los

simbiontes están presentes pero sin mostrar un efecto evidente en el hospedero (Selvin *et al.*, 2009). Esta amplia variedad de microorganismos juegan papeles importantes en las esponjas hospederas, como la adquisición de nutrientes, estabilización del esqueleto de la esponja, procesamiento de los residuos metabólicos y producción de metabolitos secundarios (Hentschel *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2010). Mientras el hospedero proporciona un sustrato para el microorganismo, que utiliza como nicho y aprovecha los productos del metabolismo (Hill, 2004).

2.2. Mecanismos de resistencia bacteriana.

Los microorganismos han sido muy importantes en la producción de fármacos de origen natural. De 23,000 compuestos activos obtenidos a partir de microorganismos, el 42% ha sido aportado por hongos y un 32% por bacterias filamentosas, los actinomicetos (Demain, 2013). Debido al aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos existentes se ha visto la necesidad de la búsqueda de nuevos compuestos que puedan ser empleados como fármacos. Actualmente los microorganismos marinos son de gran interés como una nueva y prometedora fuente de compuestos biológicamente activos (ElAhwany *et al.*, 2013).

Los agentes antibacterianos se clasifican según la forma de acción, ya sea mediante la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana, inhibiendo la síntesis de proteínas, interfiriendo con la síntesis de los ácidos nucleicos, inhibiendo rutas metabólicas y dañando la estructura de la membrana bacteriana (Tenover, 2006).

Las bacterias pueden presentar varias formas de resistencia, ya sea mediante la resistencia intrínseca o natural sobre fármacos y/o de forma adquirida. Uno de los métodos de resistencia adquirida es la adquisición de genes que codifican para enzimas que inactivan los fármacos antes de que de que puedan cumplir su efecto. Otro, es mediante la formación de bombas de flujo que les permiten la eliminación del agente antimicrobiano antes que pueda unirse a su blanco. También mediante la adquisición de genes que pueden intervenir en rutas metabólicas produciendo cambios en la pared (Delcour, 2009). Para estos mecanismos las bacterias utilizan varias estrategias genéticas, algunas se basan principalmente en la transferencia de

genes de resistencia mediante plásmidos y su estabilización en el cromosoma bacteriano por medio de integrones y otras realizan mutaciones en genes de importancia o modificaciones a nivel traduccional (Tenover, 2006; Correa-Gómez, 2012).

3. ANTECEDENTES

3.1 Diversidad filogenética de bacterias Gram positivas.

Las bacterias Gram positivas presentan una pared celular que consiste en una capa gruesa de peptidoglicano, a excepción de unos pocos géneros un tanto inusuales que carecen de una pared celular por completo (Gotang, 2008; Murphy *et al.*, 2012). Este grupo está compuesto principalmente por bacterias quimiorganotrofas, llegan a producir esporas en respuesta a la inanición o por condiciones químicas o físicas estresantes. Las bacterias Gram positivas aerobias son generalmente saprofitas y además son importantes productores de compuestos bioactivos (Gotang, 2008). Aunque las bacterias Gram positivas más estudiadas incluyen patógenos humanos, actinomicetos aislados de suelo y productores de antibióticos, poco se conoce acerca de la diversidad y distribución de este grupo de microorganismos en el ambiente marino, a pesar de que los aislamientos de estas bacterias a partir de fuentes marinas se remonta varias décadas atrás (Gotang *et al.* 2007).

Se reconocen dos Fila principales de bacterias Gram positivas. Uno de ellos es Firmicutes, que incluye géneros bien conocidos tales como *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Clostridium*. El otro Fila es Actinobacteria, que incluye algunas de las bacterias más típicas de vida terrestre pertenecientes a los géneros *Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Frankia*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Propionibacterium* y *Streptomyces*.

El nombre Firmicutes se deriva de las palabras del latín “*firmus*” y “*cutis*” que significan “fuerte” y “piel” respectivamente. Estas bacterias son generalmente unicelulares con un bajo contenido de G+C. En este fila se encuentra la familia Bacillaceae, de dónde se han reportado la mayoría de los metabolitos secundarios

para este fila, particularmente obtenidos de cepas del género *Bacillus* (Murphy *et al.* 2012).

En cuanto a las actinobacterias, la mayoría son aerobias, pero algunas pueden crecer bajo condiciones anaerobias y al contrario que Firmicutes, tienen alto contenido de G+C. En 1875 se describió la primer actinobacteria perteneciente al género *Streptothrix*, sin embargo por su morfología filamentosa se clasificó originalmente como un hongo. Para diferenciar a las actinobacterias de los hongos, en 1917 se propuso el orden Actinomycetales. Las actinobacterias, conocidas también como actinomicetos presentan una morfología y fisiología muy diversa. La mayoría de estos microorganismos producen filamentos ramificados y forman micelios (Gotang, 2008; Murphy *et al.* 2012). Se creía que las actinobacterias aisladas a partir de fuentes marinas tenían un origen terrestre debido a que la mayoría de estos microorganismos presentan semejanzas o las mismas características que las especies terrestres y que las cepas aisladas eran esporas inactivas que se encontraban en la columna de agua, sin embargo, se han aislado y caracterizado especies de actinomicetos marinos cuyos requerimientos de salinidad para su crecimiento no les permiten vivir en otros ambientes (Mincer *et al.*, 2002; Ward y Bora, 2006; Yoshida *et al.*, 2008). El género *Salinispora* fue aislado en 1991 en lugares geográficamente diversos del trópico y subtropical pero hasta el año 2005 se identificó como un organismo marino obligado (Maldonado *et al.*, 2005; Fenical y Jensen, 2006). A partir de entonces, muchos estudios de actinobacterias marinas se han centrado en cepas de este género, del cual se han identificado las especies *S. tropica*, *S. arenicola* y una tercera que sigue en revisión, propuesta como *S. pacifica* (Maldonado *et al.*, 2005).

3.2. Compuestos bioactivos de bacterias Gram positivas.

En el ambiente natural, los antibióticos y otros metabolitos secundarios cumplen diversas funciones que están relacionadas con la supervivencia de los microorganismos. Su producción es inducida en la fase estacionaria en condiciones de limitación de nutrientes. Se piensa que los agentes antimicrobianos confieren una ventaja selectiva en la competencia con otras bacterias con las que comparten

hábitat, además la producción de metabolitos secundarios incluyen la prevención de ser fagocitados por los arqueocitos de la esponja, así como establecer relaciones simbióticas con el hospedero (Hentschel *et al.*, 2001; Selvin *et al.*, 2004).

De *Bacillus amyloliquefaciens* aislado de sedimento marino se aísla el compuesto Macrolactina A (una lactona de 24 miembros) que presenta una notable actividad antimicrobiana y antiviral frente *Herpes simplex*. Hasta la fecha, se han aislado por lo menos 18 macrolactinas producidas por cepas marinas pertenecientes a *B. marinus*, *B. subtilis*, *B. polyfermenticus* y *Bacillus* sp. (Lu *et al.*, 2008; Murphy *et al.*, 2012). De *B. cereus* aislado del caracol marino *Littorina* sp., se encontró que produce un péptido cíclico con actividad citotóxica (Wang *et al.*, 1995). Mientras de *B. silvestris* aislado de un cangrejo en las costas de Chile produce el péptido cíclico Bacillistatina 1 con actividad antibacteriana (Pettit *et al.*, 2009).

En estudios donde se cultivaron más de cien cepas de *Salinispora* spp. para probar la bioactividad de sus metabolitos secundarios se demostró que un 35% tiene actividad antibacteriana frente a cepas de patógenos resistentes (Mincer *et al.*, 2002). De estos microorganismos se obtuvieron las salinosporamidas 1 y 2, las cuales presentan una inhibición específica sobre el proteosoma, además de resultados favorables en evaluación preclínica frente a cáncer de mama, colon y pulmón no microcítico (Groll *et al.*, 2006; De la Calle, 2007). Otros compuestos aislados a partir de estos actinomicetos son los salinicetales A y B, que inhiben la inducción de la ornitina descarboxilasa, importante para la quimioprevención del cáncer (Williams *et al.*, 2007). Otro actinomiceto marino de interés farmacológico es la cepa *Marinispora* (MAR2) del cual se aislaron una serie de compuestos de tipo marinomicina, teniendo como ejemplo a la marinomicina A, la cual es un potente agente antitumoral y antibacteriano, que inhibe el crecimiento de bacterias patógenas para el hombre como *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecium* con una concentración mínima inhibitoria de 0.1 μ M (Fenical y Jensen, 2006).

A partir de estudios en sedimentos marinos en la India, se aislaron 192 cepas, de las cuales 68 fueron morfológicamente distintas, todas estas pertenecientes a diferentes géneros siendo el predominante *Streptomyces* seguido de *Actinopolyspora*, *Saccharopolyspora*, *Actinomadura*, *Nocardiopsis*, *Micromonospora*,

Actinomyces, *Actinoplanes* y *Microbispora* (Vijayakumar *et al.*, 2007). También de sedimento marino en la bahía de Ancón, Perú, se aislaron 29 cepas de actinomicetos marinos, a las cuales se les probó su actividad antimicrobiana frente a las cepas patógenas *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* teniendo resultados favorables en la inhibición de estos patógenos (León *et al.*, 2011).

3.3. Estudios químicos de bacterias Gram positivas aisladas de esponjas.

Diversos estudios han descrito el aislamiento de compuestos bioactivos de un gran número de bacterias asociadas a esponjas (Tabla 1).

Tabla 1. Compuestos obtenidos de bacterias Gram positivas aisladas de esponjas.

Esponja	Microorganismo	Compuesto	Actividad	Referencia
<i>Halichondria japónica</i>	<i>Bacillus cereus</i>	Peptido cíclico	Antibacteriana	Suzumura <i>et al.</i> (2003)
<i>Acanthella acuta</i>	<i>B. pumilus</i> AAS3	GG11	Antitumoral	Ramm <i>et al.</i> (2004)
<i>Haliclona simulans</i>	<i>Bacillus</i> sp. BC1	Sin definir	Antibacteriana	Wang <i>et al.</i> (1998)
<i>H. simulans</i>	<i>Bacillus</i> sp. BC2	Sin definir	Antibacteriana	Wang <i>et al.</i> (1998)
<i>A. aerophoba</i>	<i>Bacillus</i> sp. SB8	Sin definir	Antibacteriana	Zheng <i>et al.</i> (2000)
<i>A. aerophoba</i>	<i>Bacillus</i> sp. SB17	Sin definir	Antibacteriana	Zheng <i>et al.</i> (2000)
<i>A. aerophoba</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	Sin definir	Antibacteriana	Zheng <i>et al.</i> (2000)
<i>A. aerophoba</i>	<i>B. subtilis</i> A184	Surfactina, iturina y fengicin	Antifúngica, antibacteriana hemolítica	Pabel <i>et al.</i> (2003)
<i>A. aerophoba</i>	<i>B. subtilis</i> A190	Surfactina	Antifúngica hemolítica	Pabel <i>et al.</i> (2003)
<i>A. aerophoba</i>	<i>B. subtilis</i> A202	Iturina	Antifúngica hemolítica	Pabel <i>et al.</i> (2003)
<i>A. aerophoba</i>	<i>B. pumilus</i>	Pumilacidin	Antibacteriana	Pabel <i>et al.</i> (2003)

<i>H. simulans</i>	<i>B. subtilis</i>	Subtilomicina	Antibacteriana	Phelan <i>et al.</i> (2011)
<i>Xetospongia</i> sp.	<i>Micrococcus luteus</i>	Triclosan y Lutosida	Antibacteriana	Bultel-Ponce <i>et al.</i> (1998)
<i>Acanthostrongylophora</i> sp.	<i>Micromonospora</i> sp.	Manzamina A	Antitumoral antimalaria	Dunlap <i>et al.</i> (2007)
<i>Craniella australiensis</i>	<i>Streptomyces</i> sp.	Quitinasa	Antifúngica	Han <i>et al.</i> (2009)
<i>Dendrilla nigra</i>	<i>Streptomyces dendra</i> sp. Nov. MS1051	Sin definir	Antibacteriana	Selvin <i>et al.</i> (2004)
<i>D. nigra</i>	<i>Streptomyces</i> sp. BLT7	Sin definir	Antibacteriana	Selvin <i>et al.</i> (2004)
<i>Halichondria panacea</i>	<i>Microbacterium</i> sp.	1-O-acil-3-[R-glucopiranosil-(1-3) - (6-O-acil-R-manopiranosil)]-glicerol	Antitumoral	Wicke <i>et al.</i> (2000)
<i>H. simulans</i>	Varias cepas de <i>Streptomyces</i> sp. SM1 a SM19	Sin definir	Antibacteriana	Wang <i>et al.</i> (1998)
<i>Mycale plumose</i>	<i>Saccharopolyspora</i> sp. Nov.	Metacicloprodigosina	Anticancerígena	Liu <i>et al.</i> (2005)
<i>Suberea clavata</i>	<i>Salinospora</i> sp.	Rimfacina B	Antibiótico	Kim <i>et al.</i> (2005); Mincer <i>et al.</i> (2002)
<i>A. aerophoba</i>	<i>Micrococcus</i> sp. SB58	Sin definir	Antibacteriana	Zheng <i>et al.</i> 2000)
<i>A. aerophoba</i>	<i>Arthrobacter</i> sp. SB95	Sin definir	Antibacteriana	Zheng <i>et al.</i> (2000)
<i>A. aerophoba</i>	<i>Streptomyces</i>	Valinomicina	Antiparasitario	Pimentel-Elardo <i>et al.</i> , (2010)

Thomas *et al.* (2010), realizaron una compilación de las comunidades microbianas asociadas a esponjas y los metabolitos secundarios que estas producen, donde destaca el filo Actinobacteria como predominante en la producción de compuestos bioactivos con un 46.6%, seguido de las Proteobacterias con un 23.3% y Firmicutes que aporta un porcentaje del 11.6.

3.4 Aislamiento de bacterias Gram positivas de esponjas marinas.

Es de particular interés la presencia de actinomicetos en las comunidades microbianas asociadas a esponjas, de las esponjas *Rhopaloeides odorabile*, de un arrecife coralino en Australia, *Aplysina aerophoba* y *Theonella swinhoei* se han aislado nuevas especies de actinomicetos (Webster *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2005). De una esponja de la clase hexactinélida de aguas profundas en las Antillas holandesas se aisló la cepa *Tsukamurella spongiae* (Olson *et al.*, 2007). Mientras que de la esponja *Dendrilla nigra* se aislaron varias especies de actinomicetos de los géneros *Streptomyces*, *Micromonospora* y *Sccharomonospora* (Selvin *et al.*, 2009). Lo que sugiere que las esponjas son una excelente fuente para el aislamiento de nuevas especies de actinobacterias.

De la esponja *Haliclona* sp. se aislaron los actinomicetos *Streptomyces*, *Nocardiosis*, *Micromonospora* y *Verrucosispora* siendo éste último aislado por primera vez de una esponja (Jiang *et al.*, 2007). En estudios realizados con la esponja *Lochotra* sp. se aisló la cepa de *Nocardiosis alba*, evaluándola como un productor biosurfactante (Gandhimathi *et al.*, 2009).

En la esponja *Craniella australiensis* se evaluó la actividad biológica de los actinomicetos aislados, predominando las cepas de *Streptomyces* sp. y *Actinomycetales bacterium*, los cuales demostraron actividad frente a cepas patógenas para el hombre como *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* y *Pacecilomyces variotii* (Li y Liu, 2006).

De la esponja *Hymeniacidon perleve* recolectada en los mares de China se aislaron diferentes cepas de actinomicetos como *Salinispora pacifica*, *S. arenicola*, *Nocardia araoensis*, *Gordonia terrae*, *Streptomyces* sp. y *Mycobacterium* sp. (Sun *et*

al., 2010). De la esponja *Hymeniacidon perleve* se aislaron los actinomicetos *Streptomyces*, *Nocardiopsis*, *Pseudonocardia*, *Nocardia*, *Micromonospora*, *Rhodococcus* y *Actinoalloteichus*, mientras que de la esponja *Spongia* sp. se identificaron las cepas *Streptomyces*, *Nocardiopsis* y *Pseudonocardia*, ambas esponjas recolectadas también de los mares de China (Xin *et al.*, 2008).

Un estudio de las comunidades microbianas asociadas a la esponja *A. gerardogreeni* en el Golfo de California, permitió el aislamiento de cepas pertenecientes al phyla Firmicutes, y en menor proporción Actinobacterias del género *Micrococcus*, las cuales presentaron actividad antibacteriana frente a cepas de bacterias patógenas para el hombre como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Águila-Ramírez, 2012).

En cuanto a la variación estacional de los actinomicetos, en cepas aisladas de agua y sedimento marino se ha observado que estos microorganismos presentaron una variación en su abundancia, presentando el mayor número de aislamientos en las estaciones cálidas secas (Ghanem *et al.*, 2000). En otros estudios la abundancia de los aislamientos de actinomicetos de agua de mar fue menor en invierno (de septiembre a mayo), mientras que en junio y julio se obtuvo una mayor abundancia de estos microorganismos (Klausen *et al.*, 2006).

Investigaciones realizadas en aguas de la bahía de Tokio mostraron que el aislamiento de cepas cultivables de actinomicetos varió estacionalmente, mostrando que en mayo se presentó una prominente abundancia de ciertos géneros de actinomicetos pero una baja diversidad, por el contrario en mayo y diciembre la diversidad fue alta, pero se presentó una baja abundancia, esto debido a variables en la disponibilidad de nutrientes y a factores fisicoquímicos (Yoshida *et al.*, 2008).

4. JUSTIFICACIÓN.

Diversos estudios han demostrado que las bacterias Gram positivas tienen un gran potencial en la búsqueda y descubrimiento de nuevas sustancias bioactivas que poseen relevancia biomédica e industrial. A partir de este grupo se han aislado prácticamente la mitad de los compuestos bioactivos obtenidos a partir de microorganismos. Sin embargo, en los últimos años el número de nuevos grupos y de compuestos obtenidos a partir de este grupo de bacterias ha disminuido, por lo que se ha visto la necesidad de buscar nuevas fuentes para su aislamiento, en este sentido, las esponjas representan ser un excelente medio para aislar grupos de bacterias con diferentes actividades biológicas. En México, son pocos los estudios que se han enfocado al estudio de microorganismos asociados a esponjas, mucho menos en específico de las bacterias Gram positivas, por lo que resulta interesante conocer y cultivar bacterias Gram positivas aisladas de la esponja *Aplysina clathrata* de Punta Arena de La Ventana, con la finalidad de evaluar su actividad antimicrobiana frente a cepas de bacterias patógenas resistentes y determinar su posible potencial farmacológico, así como probar su actividad hemolítica como un recurso preliminar para su posible utilización como agentes biosurfactantes.

Tomando en cuenta lo antes mencionado, se formularon las siguientes preguntas

- 1) ¿Las bacterias Gram positivas presentan actividad antimicrobiana y hemolítica?,
- 2) ¿Existe una variación estacional en cuanto a su abundancia y actividad biológica?

5. HIPÓTESIS.

A partir de la esponja *Aplysina clathrata* se logrará el aislamiento de una gran diversidad de bacterias Gram positivas, utilizando un protocolo de aislamiento que involucre condiciones de cultivo estrictas que aumenten la posibilidad de encontrar cepas que presenten una actividad biológica interesante. Dicha diversidad no será constante a lo largo del año sino que presentarán una evidente variación estacional.

6. OBJETIVOS.

6.1. General.

Identificar, caracterizar y evaluar la actividad antimicrobiana y hemolítica de bacterias cultivables Gram positivas asociadas a la esponja *Aplysina clathrata* de Punta Arena de La Ventana, B.C.S., México.

6.2. Particulares.

- Aislar e identificar molecularmente bacterias cultivables Gram positivas a partir de la esponja *A. clathrata* en diferentes épocas del año.
- Evaluar la actividad antimicrobiana y hemolítica de las bacterias Gram positivas aisladas.
- Analizar la variación estacional de las bacterias Gram positivas asociadas a la esponja, durante un ciclo anual.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1. Obtención del material biológico.

Las esponjas fueron recolectadas de manera estacional durante el ciclo anual 2012, en los meses de marzo (invierno), junio (primavera), septiembre (verano) y noviembre (otoño), mediante buceo SCUBA en el arrecife rocoso de Punta Arena de La Ventana, B.C.S. (Lat. 24°03'40''N y Long. 109°49'52''W). El material biológico obtenido se transportó en hielo hasta el laboratorio de Microbiología del CICIMAR donde se procesó de manera inmediata.

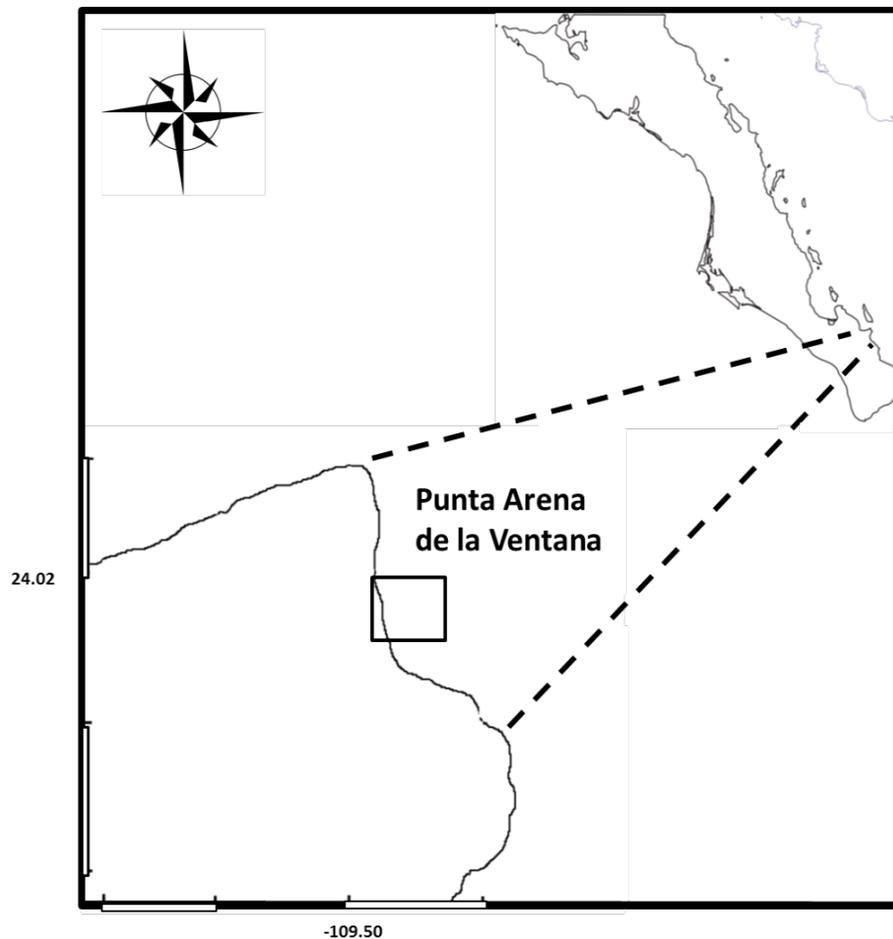


Figura 2. Área de recolección de los ejemplares de *Aplysina clathrata*.

7.2. Aislamiento y caracterización morfológica de las bacterias Gram positivas asociadas a *Aplysina clathrata*.

7.2.1. Preparación de medios de cultivo.

Para el aislamiento de los microorganismos se utilizaron diferentes medios de cultivo (Tabla 2): agar marino (M1), medio suplementado con arginina (M2), y medio suplementado con asparagina (M3) se ha observado que estos medios favorecen un mayor aislamiento de morfotipos cultivables (Sun *et al.*, 2010). Los medios previamente mencionados se utilizaron como base con la adición del extracto acuoso de la esponja de donde se aislaron los microorganismos (M4, M5 y M6) para simular la composición *in situ* (Bull y Stach, 2007). A cada uno de los medios se les adicionó Ac. Nalidíxico y Nistatina a una concentración de 25 µg mL.

Tabla 2. Composición de medios de cultivo empleados para el aislamiento de bacterias Gram positivas asociadas a *Aplysina clathrata*.

Medio de Cultivo	Composición	Referencia
M1	10g de almidón soluble, 4g de extractos de levadura, 2g de peptona, 18g de agar y 1 L H ₂ O de mar artificial	Mincer <i>et al.</i> (2002)
M2	6ml de glicerol, 1g arginina, 1g K ₂ HPO ₄ , 0.5 g MgSO ₄ , 18g de agar y 1 L H ₂ O de mar artificial	Mincer <i>et al.</i> (2002)
M3	0.1 g L-asparagina, 0.5g K ₂ HPO ₄ , 0.001 g FeSO ₄ , 0.1g MgSO ₄ , 2g Peptona, 4g de propinato de sodio, 18g de agar y 1 L H ₂ O de mar artificial	Zhang <i>et al.</i> (2006)
M4	M1 más extracto acuoso de la esponja	Mincer <i>et al.</i> (2002); Sun <i>et al.</i> , (2010)
M5	M2 más extracto acuoso de la esponja	Mincer <i>et al.</i> (2002); Zhang <i>et al.</i> (2006)
M6	M3 más extracto acuoso de la esponja	Zhang <i>et al.</i> (2006)

Para la obtención del extracto acuoso de la esponja, se maceraron 120 g de tejido en 120 mL de agua de mar artificial y posteriormente fue filtrado repetidamente por mallas de 1 μm . El líquido resultante se centrifugó a 5000 rpm durante 20 minutos, el sobrenadante se recuperó por decantación y se volvió a centrifugar durante 20 minutos. En ambiente estéril, el sobrenadante se filtró con ayuda de un sistema de filtración con bomba de presión y membranas de 0.45 μm , proceso que se repitió dos veces. Finalmente el extracto se esterilizó por filtración con membranas de 0.2 μm .

7.3. Identificación molecular de las bacterias asociadas a *Aplysina clathrata*.

7.3.1. Aislamiento de ADN

Debido a que muchas de las cepas aisladas crecieron formando micelio, fue necesario disgregarlo previamente para realizar la extracción de ADN. Además estas cepas crecen fuertemente adheridas al agar, por ello se cultivaron en el medio líquido en el que fueron aisladas y se mantuvieron en agitación durante 5 a 7 días a 33°C. Cuando la biomasa fue suficiente, se llevó a cabo la cosecha de las células, 1.5 mL de la muestra del cultivo se puso en tubo de 1.7 mL y se centrifugaron a 14000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se decantó y al botón formado se le adicionaron 575 μL de buffer TE (Tris-EDTA pH 8.0), y perlas de vidrio para ser homogenizados en un vortex a máxima velocidad, seguido de esto se sometieron a otro paso de disrupción en el Sonicador durante 4 minutos. Posteriormente se agregaron 5 μL de lisozima (1 mg mL⁻¹) a cada tubo y se incubaron durante 1 hora a 37° C agitando cada 10 minutos para facilitar la acción de la enzima (Soler-Hernández, 2012). Las cepas que no forman micelio o no se adhirieron al agar se suspendieron directamente del medio líquido en TE.

Posteriormente se añadieron 30 μL de dodecil sulfato sódico (SDS) al 10% y 3 μL de Proteinasa K (20 mg mL⁻¹), los tubos se volvieron a agitar en un vortex y se incubaron durante una hora a 37° C. Transcurrido este tiempo se adicionaron 100 μL de NaCl 5M y 80 μL de Bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB) mezclando por

inversión e incubando 10 minutos a 65° C. Posteriormente, se agregó un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), y nuevamente se mezcló por inversión y se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se recuperó y se transfirió a tubos nuevos. Se realizó una segunda extracción con un volumen igual de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) mezclándose por inversión. Los tubos se centrifugaron nuevamente a 14000 rpm por 5 minutos. La fase acuosa se recuperó y la precipitación del ADN se llevó a cabo adicionando un volumen de isopropanol preenfriado. Los tubos se incubaron a -20° C durante toda la noche. Transcurrido el tiempo de incubación los tubos se centrifugaron a 14000 rpm por 20 minutos. Los botones resultantes (ADN) se lavaron con etanol al 70% preenfriado y se centrifugaron nuevamente; este lavado se realizó en dos ocasiones. Finalmente el botón se resuspendió en 50 µL de TE y el ADN se visualizó con luz ultravioleta en geles de agarosa al 1% teñidos con SYBER GOLD y se documentaron en un fotodocumentador BioDoc-It™ (Sambrook y Russell 2001; Ausubel *et al.*, 2002).

7.3.2. Amplificación de ADN mediante PCR

El ADN se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando oligonucleótidos específicos para la clase Actinobacteria, SC-Act-235aS20 (CGC GGC CTA TCA GCT TGT TG) y SC-Act-878aA19 (CCG TAC TCC CCA GGC GGG G) para amplificar la región variable V3-V5 de la sub-unidad pequeña del ácido ribonucléico ribosomal (ARNr) 16S (Stach *et al.* 2003) y una mezcla de oligonucleotidos, uno universal para bacterias Gram positivas 27F (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) y el específico de actinobacterias SC-Act-878aA19, para amplificar la región variable V1-V3 de la sub-unidad pequeña del ácido ribonucléico ribosomal (ARNr) 16S (Farris & Olson, 2007).

Para determinar la temperatura de elongación de los diferentes pares de oligonucleótidos utilizados, se realizaron reacciones de PCR en gradiente de temperatura. Así el programa de reacción se determinó dependiendo de las temperaturas en la que se presentó la mejor banda de amplificación. La reacción de amplificación contuvo 100 ng de ADN, 1 µL de cada oligonucleótido, 5 µL de 10X

buffer PCR, 0.2 mM de dNTP's, 0.075 Mm de MgCl₂, 1 U de Taq polimerasa (INVITROGEN) y agua Mili-Q para tener un volumen final de 50 µL.

Las reacciones se amplificaron en un termociclador BioRad con el siguiente programa para la mezcla de los oligonucleótidos 27F y SC-Act-878aA19: Un ciclo de desnaturalización a 95°C durante 3 minutos, 30 ciclos de 95°C durante un minuto, 50°C por un minuto y 72°C por 2 minutos, seguidos de una fase de extensión final a 72°C por 15 minutos (Farris y Olson, 2007).

Mientras que para las reacciones con los oligonucleótidos específicos de Actinobacterias SC-Act-235aS20 y SC-Act-878aA19 el programa utilizado fue: Un ciclo de desnaturalización de 94°C durante 5 minutos, 35 ciclos de 94°C durante 40 segundos, 55°C durante 40 segundos y 72°C durante 1 minuto, seguidos de una fase de extensión final de 72°C por 7 minutos.

Los productos de PCR se evaluaron en geles de agarosa al 1%, de cada reacción se tomaron 1.0 µL que se mezclaron con 1 µL de buffer de carga (LB) (Sambrook y Russell 2001), la electroforesis se corrió a 70V durante 30 minutos, los geles fueron teñidos con SYBER GOLD y los resultados se documentaron en un fotodocumentador BioDoc-It™.

7.3.3. Secuenciación y análisis filogenético.

Los productos PCR fueron enviados a la empresa MACROGEN (Corea del Sur) donde fueron purificados y secuenciados. Las secuencias obtenidas fueron analizadas y editadas utilizando el programa FinchTv, posteriormente se realizó el análisis de alineamiento *Blast* entre las secuencias obtenidas y aquellas reportadas en el NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Luego se hicieron alineamientos entre todas las secuencias obtenidas mediante la rutina *MUSCLE* incluida en el programa MEGA5, los gráficos de identidad se realizaron mediante el programa GeneDoc y los árboles filogenéticos que nos permitieron evaluar la posición taxonómica de las bacterias fueron generados usando el método del vecino más cercano, los cuales fueron realizados en el programa MEGA5.

7.4. Ensayo de actividad antimicrobiana.

Para probar la bioactividad de las cepas aisladas se realizó un ensayo preliminar *in vitro*. Se utilizaron cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Candida albicans*. Para los bioensayos las cepas se sembraron en agar TSA y PDA para *C. albicans*, se incubaron por 24 h a 35° C. Por otro lado, se prepararon placas con agar Mueller Hinton para las pruebas y se preparó una suspensión celular con cada una de las cepas en solución salina ajustando a una concentración aproximada de 1×10^8 cel mL⁻¹ y se hizo una siembra masiva con un hisopo estéril.

A cada placa se le realizaron perforaciones con la ayuda de un sacabocados de 6 mm de diámetro en donde se colocaron alícuotas de 50 µL del sobrenadante proveniente del medio de cultivo de las cepas. Como control positivo se colocaron 25 µL de ampicilina a una concentración de 1 µg µL⁻¹. Posteriormente, las placas fueron incubadas a 35° C por 24 h. La presencia de un halo de inhibición (mm) puso de manifiesto la producción de sustancias con actividad antibacteriana.

7.5. Prueba de hemolisis.

La prueba de actividad hemolítica se realizó en medios de cultivo TSA con 5% de sangre de carnero. A cada placa se le hicieron perforaciones con la ayuda de un sacabocados de 6 mm de diámetro, en donde se colocaron alícuotas de 50 µL del sobrenadante proveniente del medio de cultivo de las cepas. Las cepas aisladas con crecimiento de 24 h fueron además resembradas en estría en las placas de agar sangre.

Las placas fueron incubadas a 35° C y se realizaron mediciones de los halos a las 6, 12, 24 y 48 h. Todas las pruebas se hicieron por triplicado.

8. RESULTADOS

8.1. Aislamiento y caracterización morfológica de las bacterias Gram positivas asociadas a *Aplysina clathrata*.

A partir de *A. clathrata* se aislaron un total de 103 cepas de bacterias Gram positivas en las diferentes épocas del año (2012) y en los diferentes medios de cultivo utilizados. Se confirmó la pureza de las cepas mediante su morfología colonial y microscópica (Anexo 2). La morfología colonial que presentaron las cepas aisladas fue muy variada, siendo las formas irregulares las predominantes, como se puede apreciar en la figura 3.

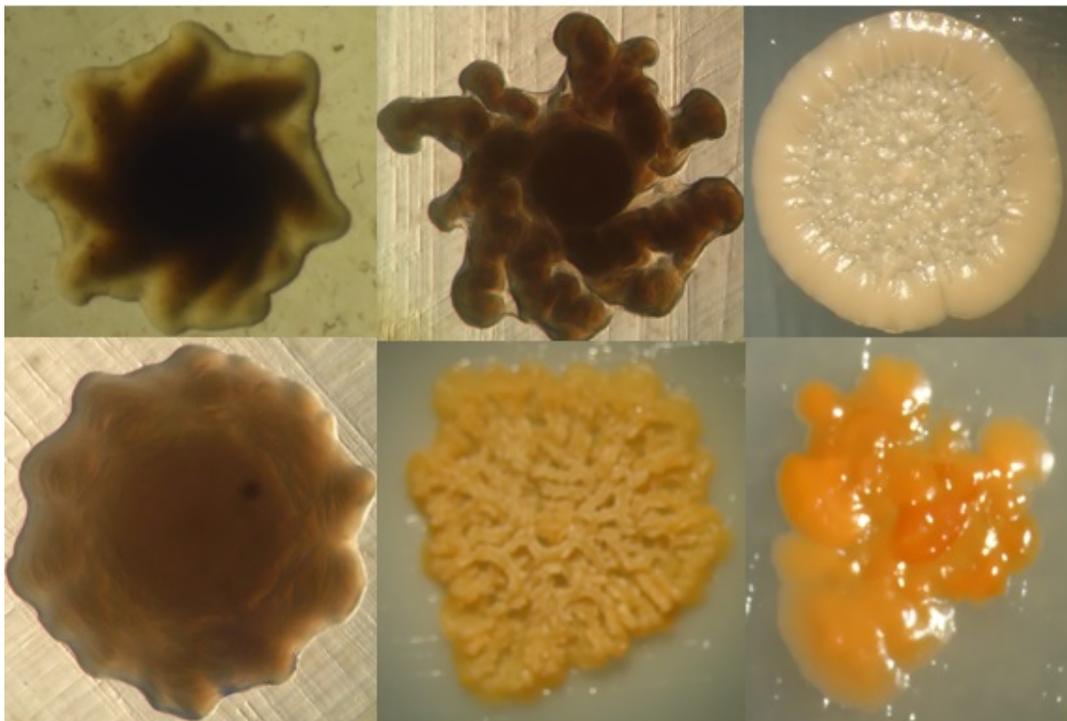


Figura 3. Diferentes morfotipos de bacterias aisladas de la esponja *A. clathrata* en las diferentes épocas del año. A) Ap0210, B) Ap0215, C) Ap0913, D) Ap0216, E) Ap0505 y F) Ap0904.

El mayor número de cepas aisladas se obtuvo en primavera (40), mientras que el menor aislamiento fue en verano (17) (Figura 4).

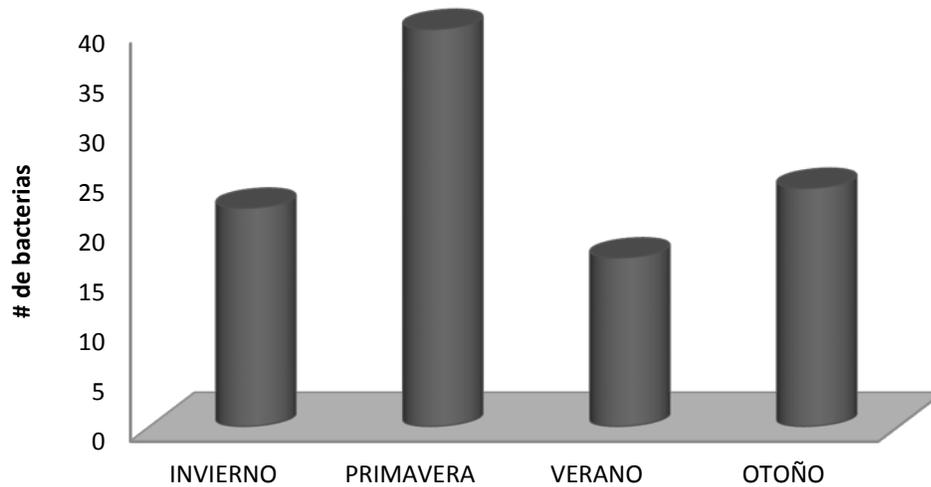


Figura 4. Variación estacional de las cepas aisladas de la esponja *Aplysina clathrata* en el ciclo anual 2012.

Con respecto al uso de diferentes medios de cultivo para el aislamiento de cepas, fue con medio M6 (asparagina con extracto de esponja) con el que se lograron los mayores aislamientos, representando el 30% del total de bacterias cultivables de la esponja *A. clathrata*, seguido del medio M3 (asparagina sin extracto de esponja) obteniéndose el 21% de las cepas. Los medios M4 y M1 presentaron porcentajes de aislamiento similares, 15 y 13% respectivamente. Mientras que en los medios M2 y M5 fue de donde se aisló el menor número de cepas, aportando el 12 y 9% (Figura 5).

Estacionalmente, el uso del medio M6 (asparagina con extracto de esponja) fue más efectivo sólo en verano y otoño (logrando aislar el 58.8 y 50% respectivamente). Mientras que para invierno y primavera fueron los medios M1 (agar marino sin extracto de esponja) y M4 (agar marino con extracto de esponja) con los que se logró el mayor aislamiento, respectivamente. Resulta evidente que en invierno y primavera en todos los medios de cultivo se logró el aislamiento de cepas, mientras que en

verano únicamente se obtuvieron aislamientos en dos medio (M3 y M6) y en otoño con cuatro medios (M1, M3, M4 y M6) (Figura 6).

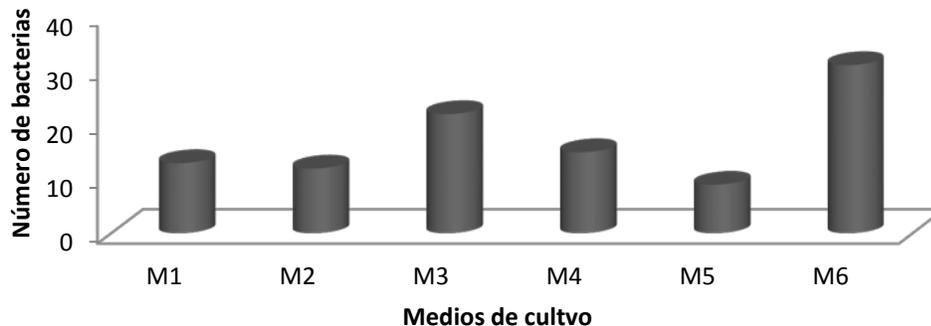


Figura 5. Aislamiento de las diferentes bacterias de la esponja *A. clathrata* en los seis diferentes medios de cultivo empleados.

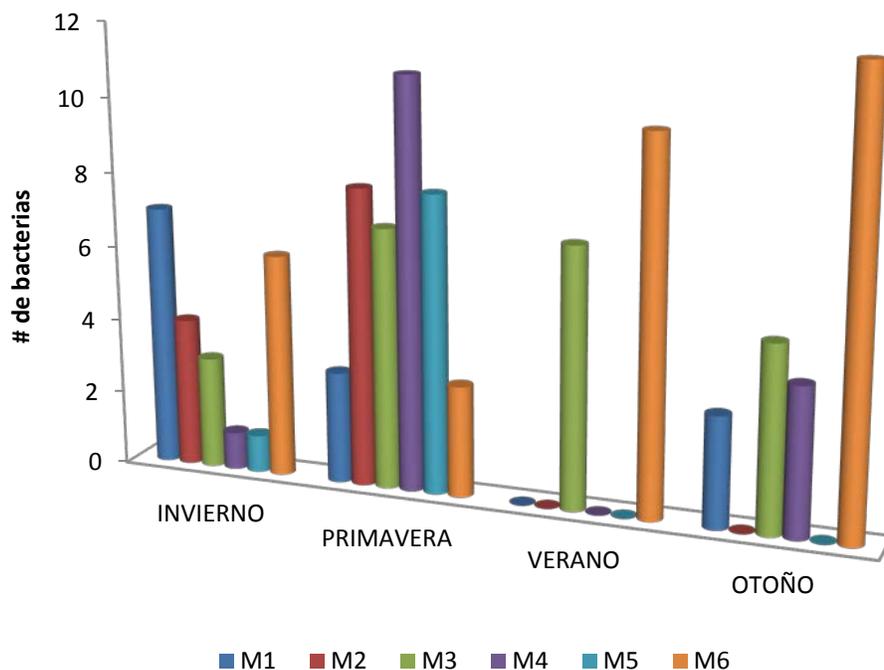


Figura 6. Aislamiento de las diferentes cepas por época y medio de cultivo. M1= agar marino; M2= arginina; M3= asparagina; M4= agar marino/extracto de esponja; M5= arginina/extracto de esponja y M6= asparagina/extracto de esponja.

8.2. Identificación molecular de las bacterias asociadas a *Aplysina clathrata*.

Las bacterias Gram positivas aisladas de *A. clathrata* fueron identificadas usando el análisis del gen ARNr 16S, mediante la extracción de ADN (con el método de cloroformo: alcohol isoamílico) y amplificación por PCR. El ADN de las bacterias aisladas en cada una de las temporadas del año 2012 fue extraído y confirmado por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Para llevar a cabo la amplificación del ADN se emplearon oligonucleótidos específicos para la clase Actinobacteria y una combinación de un oligonucleotido universal con uno específico para Actinobacterias. Aun así de las 103 cepas aisladas originalmente de la esponja *A. clathrata* solamente se lograron amplificar 41 cepas utilizando diferentes pares de oligonucleótidos. En la figura 7 se pueden observar algunos ejemplos de los productos de PCR obtenidos.

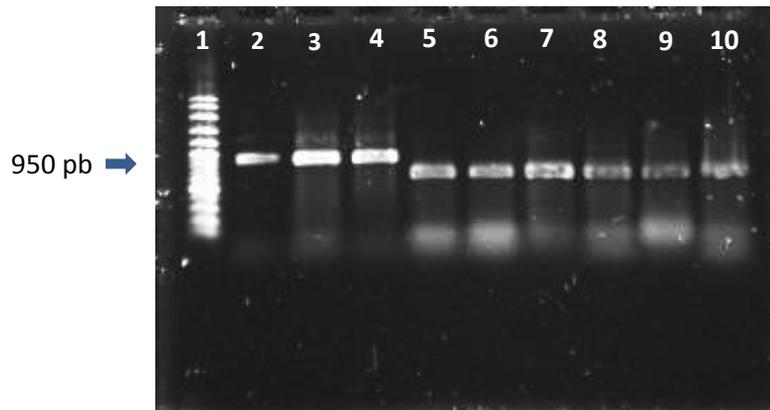


Figura 7. Productos de PCR obtenidos a partir del ADN de las bacterias aisladas de *A. clathrata*, con los dos diferentes pares de oligonucleótidos empleados 27F y Act235. 1 – Marcador molecular, 2 – Ap0507, 3 – Ap1104, 4 – Ap0201, 5 – Ap0504, 6 – Ap0505, 7 – Ap0506, 8 – Ap0512, 9 – Ap0513 y 10 – Ap0904.

Las secuencias fueron analizadas mediante un alineamiento BLAST con aquellas reportadas en el NCBI (National Center of Biotechnology Information), lo cual permitió establecer la clasificación taxonómica de las 41 cepas aisladas (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación de las bacterias asociadas a la esponja *A. clathrata* en las diferentes épocas del año con secuencias reportadas en el *NCBI*.

ID	Medio	Temporada	Especie más cercana	% identidad	Número de acceso NCBI
Ap0205	M6	Invierno	Clona de bacteria sin cultivar	100%	JF151750.1
Ap0207	M1	Invierno	<i>Bacillus</i> sp.	99%	FN179280.1
Ap0201	M1	Invierno	<i>Bacillus</i> sp.	99%	AF326373.1
Ap0203	M6	Invierno	<i>Kocuria rhizophila</i>	99%	KC429605.1
Ap0204	M2	Invierno	<i>Halobacillus kuroshimensis</i>	99%	JN128247.1
Ap0206	M2	Invierno	<i>Kocuria rhizophila</i>	99%	KC429605.1
Ap0208	M3	Invierno	<i>Micrococcus luteus</i>	91%	FJ380993.1
Ap0202	M1	Invierno	<i>Bacillus cohnii</i>	79%	KF156796.1
Ap0504	M3	Primavera	<i>Rhodococcus</i> sp.	100%	JN627179.1
Ap0505	M6	Primavera	<i>Rhodococcus</i> sp.	100%	JN627179.1
Ap0507	M4	Primavera	<i>Rhodococcus</i> sp.	100%	JN392432.1
Ap0511	M2	Primavera	<i>Halobacillus kuroshimensis</i>	100%	JN128247.1
Ap0512	M1	Primavera	<i>Ornithinimicrobium</i> sp.	100%	DQ448703.1
Ap0513	M3	Primavera	<i>Janibacter</i> sp.	100%	AB778259.1
Ap0514	M3	Primavera	<i>Rhodococcus</i> sp.	100%	JN392432.1
Ap0501	M3	Primavera	<i>Bacillus infantis</i>	99%	KC843346.1
Ap0503	M3	Primavera	<i>Bacillus algicola</i>	99%	JX005838.1
Ap0506	M3	Primavera	<i>Salinispora arenicola</i>	99%	HQ873946.1
Ap0515	M3	Primavera	<i>Rhodococcus</i> sp.	99%	JN627179.1
Ap0517	M5	Primavera	<i>Actinobacterium</i>	99%	GU061171.1
Ap0519	M3	Primavera	<i>Janibacter</i> sp.	99%	AB778259.1
Ap0518	M2	Primavera	<i>Nocardia</i> sp.	98%	JQ716952.1
Ap0508	M5	Primavera	<i>Rhodococcus</i> sp.	97%	JN627179.1
Ap0520	M4	Primavera	Clona de bacteria sin cultivar	94%	JQ032574.1
Ap0516	M4	Primavera	Clona de bacteria sin cultivar	89%	JF176836.1
Ap0510	M3	Primavera	<i>Bacillus licheniformis</i>	87%	DQ071564.1
Ap0502	M4	Primavera	Clona de bacteria sin cultivar	84%	JF151750.1
Ap0509	M3	Primavera	<i>Halobacillus</i> sp.	84%	FJ477400.1
Ap0904	M6	Verano	<i>Rhodococcus</i> sp.	100%	JN627179.1

Ap0901	M6	Verano	<i>Kocuria rosea</i>	99%	HG000002.1
Ap0902	M6	Verano	<i>Arthrobacter tumbae</i>	99%	FR877739.1
Ap0907	M6	Verano	<i>Rhodococcus</i> sp.	99%	JN627179.1
Ap0906	M3	Verano	<i>Rhodococcus</i> sp.	98%	JN392432.1
Ap0908	M6	Verano	<i>Micrococcus</i> sp.	98%	GQ163718.1
Ap0903	M3	Verano	Clona de bacteria sin cultivar	94%	GQ089469.1
Ap0905	M6	Verano	<i>Rhodococcus</i> sp.	93%	JN627179.1
Ap1101	M6	Otoño	<i>Bacillus algicola</i>	99%	JX005838.1
Ap1102	M6	Otoño	<i>Bacillus algicola</i>	99%	FR775437.1
Ap1104	M3	Otoño	Bacteria sin cultivar de <i>Bacillus</i> sp.	99%	HQ821572.1
Ap1103	M6	Otoño	<i>Brevibacterium iodinum</i>	98%	JX490101.1
Ap1105	M6	Otoño	Clona de bacteria sin cultivar	97%	KF454863.1

La gran mayoría de las bacterias aisladas comparten un alto porcentaje de identidad con aquellas reportadas en el *GenBank*, siendo el género *Rhodococcus* el mayor representado. Sólo once secuencias mostraron un porcentaje de identidad menor al 96%. Seis de las cepas secuenciadas (Ap0205, Ap0502, Ap0516, Ap0520, Ap0903 y Ap1105) se relacionaron con bacterias registradas en el *GenBank* como “Clonas de bacterias sin cultivar”, presentando las últimas cinco porcentajes de identidad menores al 98%. Mientras que la cepa Ap1104 se relaciona con un alto porcentaje de identidad con un *Bacillus* sp. no cultivable.

Se elaboraron dos árboles filogenéticos (Figura 8 y 9), con base a las secuencias obtenidas con los oligonucleótidos empleados (27F y Act235), usando el método del vecino más cercano en donde se muestran las relaciones taxonómicas de las bacterias aisladas en las diferentes estaciones del año 2012 con aquellas reportadas en el *NCBI*. En ellos se aprecian a cada lado de las ramas los porcentajes de replicación a los cuales se asocian los grupos de taxa en las pruebas *bootstrap* con 1000 repeticiones.

En el primer árbol (Figura 8), elaborado con las secuencias amplificadas a partir de los oligonucleótidos 27F, las bacterias aisladas se agruparon en dos clados, el primero representado en su mayoría por bacterias pertenecientes al filo Firmicutes y el segundo al grupo Actinobacteria. Por otra parte, las cepas Ap1101, Ap0503,

Ap1104 y Ap1102 se agrupan con distintas bacterias del género *Bacillus*. Con estos oligonucleótidos sólo se tuvieron cuatro representantes del phyla Actinobacterias, que se unieron con cepas del género *Kocuria*, *Brevibacterium* y *Rhodococcus*.

En el segundo árbol (Figura 9), elaborado con las secuencias amplificadas a partir de los oligonucleótidos Act235, se observa que la mayoría de las bacterias aisladas pertenecen al phyla Actinobacteria. Las cepas Ap0202, Ap0903, Ap0516 y Ap0502 no fueron consideradas en el análisis porque al compararlas con secuencias del *GenBank* presentaron porcentajes de identidad muy bajos.

En el anexo II, se presenta las fichas de las diferentes cepas de bacterias. Donde se incluyen secuencia y el nombre de la especie con la que mostró mayor identidad con base en los resultados obtenidos en la comparación con las secuencias registradas en el NCBI.

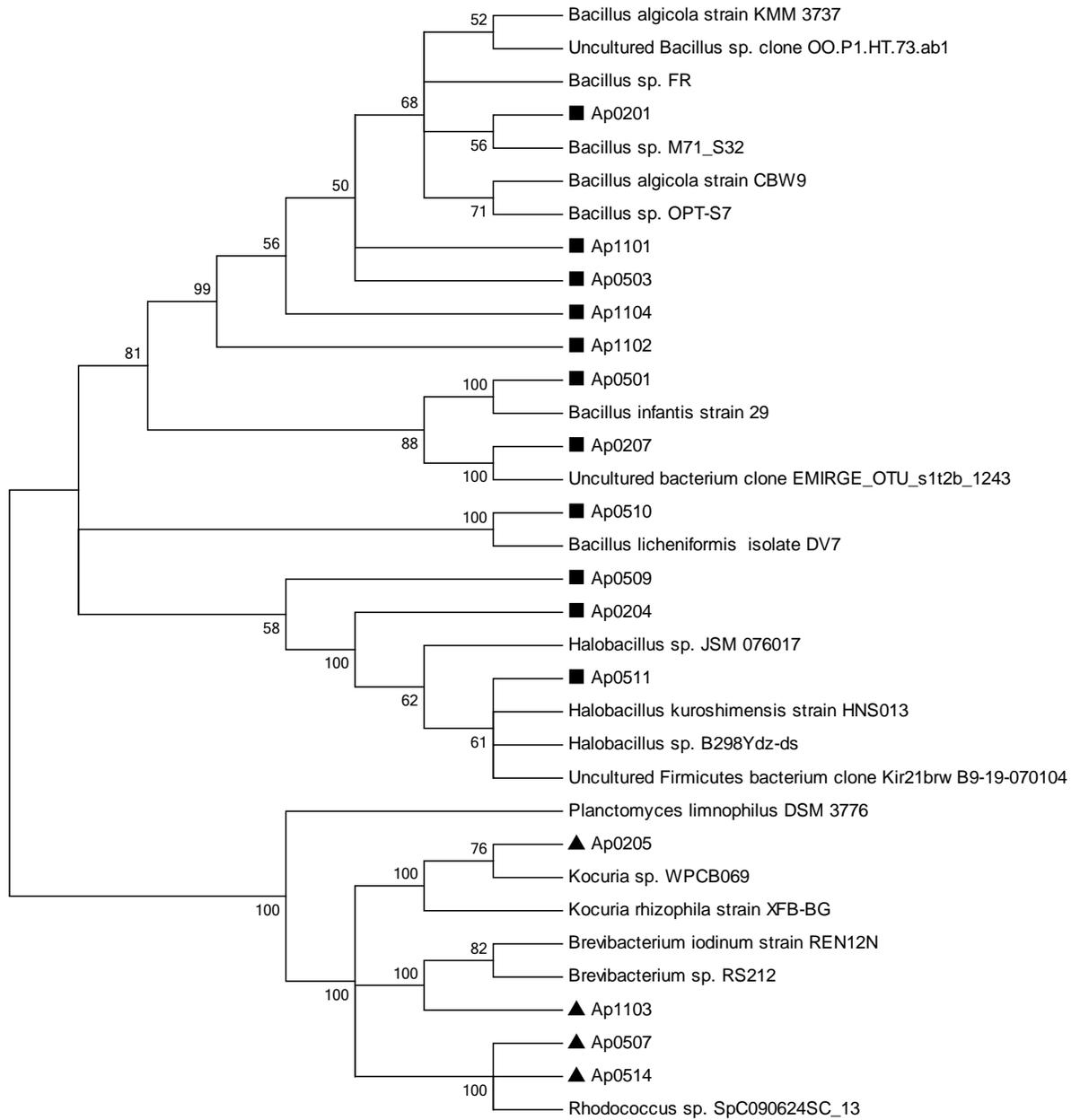


Figura 8. Árbol filogenético elaborado a partir de los oligonucleótidos 27F, de las bacterias aisladas de la esponja *A. clathrata*. ▲ Actinobacteria ■ Firmicutes □ Sin Clasificar

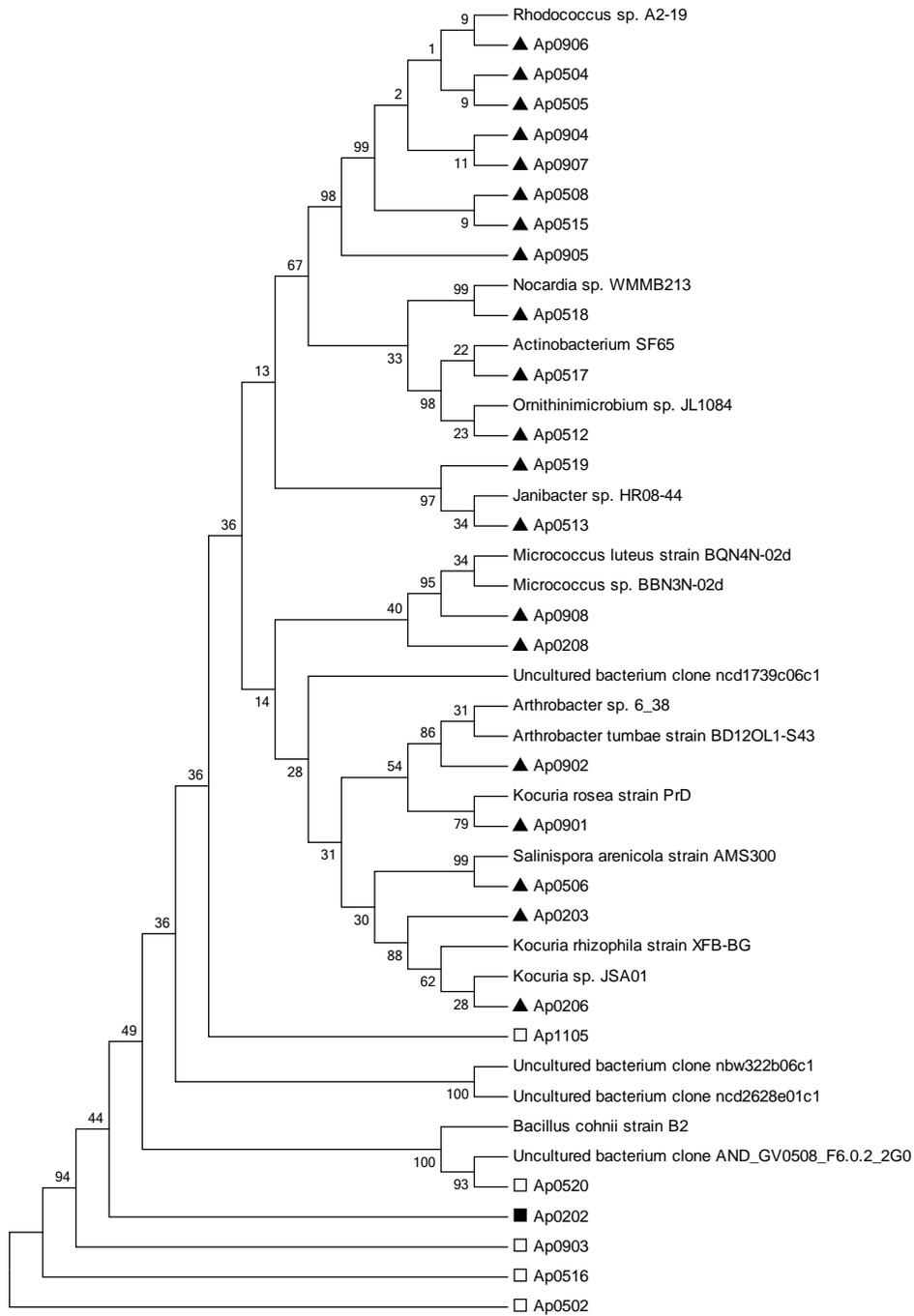


Figura 9. Árbol filogenético elaborado a partir de los oligonucleótidos Act235, de las bacterias aisladas de la esponja *A. clathrata*. ▲ Actinobacteria ■ Firmicutes □ Sin Clasificar

En resumen, las bacterias Gram positivas aisladas de *A. clathrata* en las diferentes estaciones del año 2012 corresponden en su mayoría al phyla Actinobacteria, representando el 61% de las cepas de bacterias, seguido del phyla Firmicutes que representa el 24%. Cabe aclarar que el resto de las cepas no pudieron ser identificadas debido a que se relacionaron con bacterias no cultivables (Figura 10).

Las Actinobacterias estuvieron representadas por 5 familias del orden actinomicetales, mientras que para Firmicutes las bacterias pertenecieron únicamente a la familia Bacillaceae (Tabla 4).

En cuanto a los diferentes géneros, *Rhodococcus* predominó en el aislamiento (10 cepas), seguido del género *Bacillus* (6 cepas) y *Kocuria* (4 cepas) respectivamente (Figura 11).

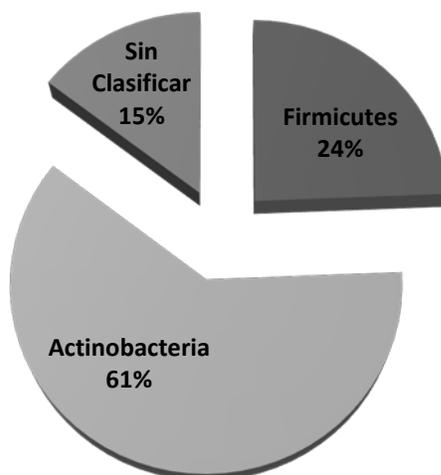


Figura 10. Porcentaje de bacterias correspondientes a los dos phyla de bacterias Gram positivas identificadas de *A. clathrata*.

Tabla 4. Posición taxonómica de las bacterias aisladas de la esponja *A. clathrata*.

Phylum	Clase	Orden	Familia	Género
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Halobacillus</i>
Firmicutes	Bacilli	Bacillales		sc
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter</i>
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	<i>Micrococcus</i>
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	<i>Kocuria</i>
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Brevibacteriaceae	<i>Brevibacterium</i>
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Nocardiaceae	<i>Rhodococcus</i>
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Nocardiaceae	<i>Nocardia</i>
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micromonosporaceae	<i>Salinispora</i>
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Intrasporangiaceae	<i>Janibacter</i>
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Intrasporangiaceae	<i>Ornithinimicrobium</i>
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales		sc

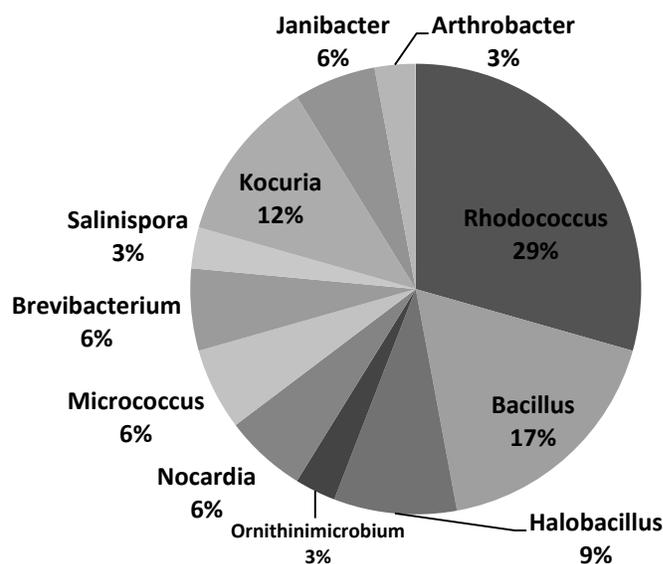


Figura 11. Representación en porcentaje de los diferentes géneros de bacterias identificadas de la esponja *Aplysina clathrata*.

En cuanto a la diversidad de especies aisladas *Rhodococcus sp.* fue la más abundante, seguida de *Kocuria rhizophila* y *Bacillus algicola* (Figura 12).

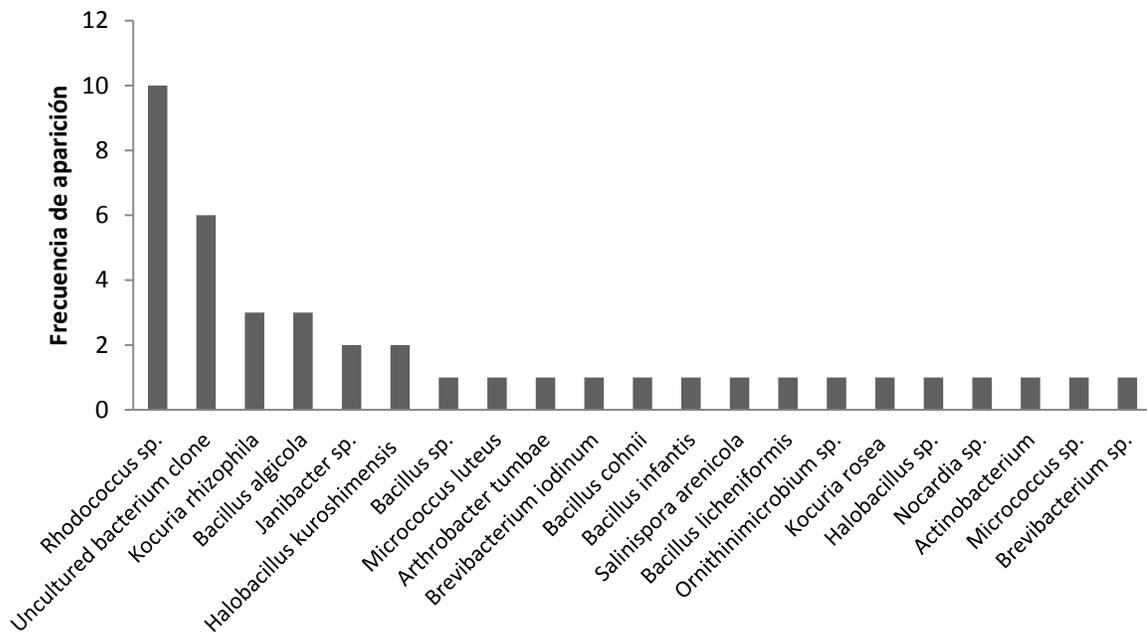


Figura 12. Especies de bacterias aisladas de la esponja *Aplysina clathrata*.

8.3. Variación temporal de las bacterias asociadas a la esponja *Aplysina clathrata*.

Tomando en consideración las cepas identificadas, se observa de manera general una variación estacional, con la mayor frecuencia de géneros en primavera y la menor en otoño. Siendo el género *Bacillus* el único que se mantiene constante en más temporadas a lo largo del año y sólo en verano no fue registrado como parte de la flora bacteriana asociada (Tabla 5). Resulta notable que la mayoría de las bacterias fueron específicas para cada época del año, a excepción de *B. algicola*, *Halobacillus kuroshimensis* y *Rhodococcus sp.* que estuvieron presentes en dos épocas (Tabla 6).

Tabla 5. Frecuencia de bacterias por género en las diferentes épocas del año.

		Invierno	Primavera	Verano	Otoño
Actinobacteria	<i>Kocuria</i>	3		1	
	<i>Micrococcus</i>	1		1	
	<i>Rhodococcus</i>		6	4	
	<i>Salinispora</i>		1		
	<i>Ornithinimicrobioum</i>		1		
	<i>Janibacter</i>		2		
	<i>Nocardia</i>		1		
	<i>Brevibacterium</i>				2
Firmicutes	<i>Bacillus</i>	2	2		3
	<i>Halobacillus</i>	1	2		

De manera general se observa que las Actinobacterias estuvieron mejor representadas en las diferentes épocas de muestreo, siendo primavera la época en la que se aisló el mayor número de representantes tanto de las Actinobacterias como de los Firmicutes en las cuatro épocas del año (Figura 13).

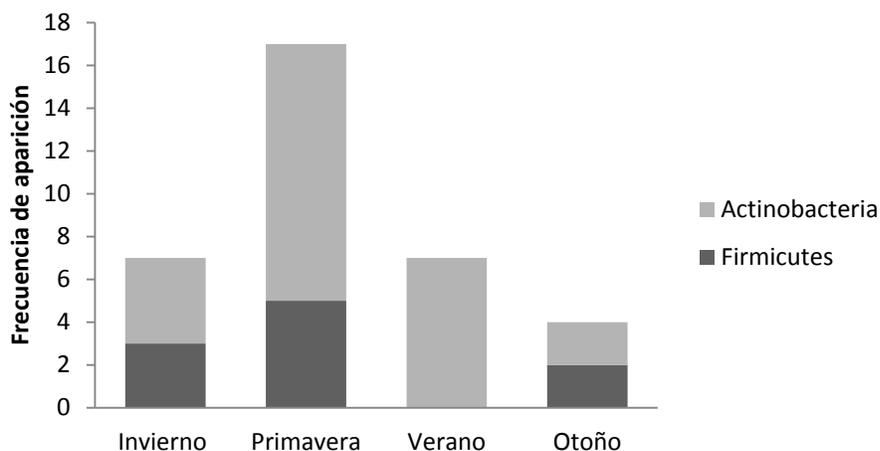


Figura 13. Representación del aislamiento de las bacterias por fila en las diferentes épocas del año.

Tabla 6. Especies de bacterias aisladas de *A. clathrata* en las diferentes épocas del año 2012.

Especie más cercana	Invierno	Primavera	Verano	Otoño
<i>Bacillus</i> sp.	X			
<i>Bacillus cohnii</i>	X			
<i>Bacillus infantis</i>		X		
<i>Bacillus algicola</i>		X		X
<i>Bacillus licheniformis</i>		X		
<i>Halobacillus</i> sp.		X		
<i>Halobacillus kuroshimensis</i>	X	X		
<i>Actinobacterium</i>		X		
<i>Arthrobacter tumbae</i>			X	
<i>Brevibacterium</i> sp.				X
<i>Brevibacterium iodinum</i>				X
<i>Janibacter</i> sp.		X		
<i>Kocuria rhizophila</i>	X			
<i>Kocuria rosea</i>			X	
<i>Micrococcus</i> sp.			X	
<i>Micrococcus luteus</i>	X			
<i>Nocardia</i> sp.		X		
<i>Ornithinimicrobium</i> sp.		X		
<i>Rhodococcus</i> sp.		X	X	
<i>Salinispora arenicola</i>		X		
Uncultured bacterium clone	X			
Uncultured bacterium clone		X		
Uncultured bacterium clone		X		
Uncultured bacterium clone			X	
Uncultured bacterium clone		X		
Uncultured <i>Bacillus</i> sp.				X

Los árboles filogenéticos obtenidos para cada época del año se muestran en la figura 14. En invierno las bacterias aisladas se relacionaron con cuatro géneros y con una bacteria marina no cultivable. (Figura 14a y 14b). En primavera, las bacterias corresponden a 8 géneros, y tres sin clasificar (Figura 14c y 14d). En esta época fue dónde se presentó el mayor número de aislamientos y se presenta una mayor diversidad en cuanto al número de géneros aislados. Las cepas Ap0502, Ap0516 y Ap0520 al ser comparadas sus secuencias en el NCBI se relacionaron con bacterias marinas no cultivables y sus porcentajes de identidad fueron de 74%, 89% y 94% respectivamente, debido a esto al intentar incluirlas en el árbol correspondiente en este periodo de muestreo causaban conflicto con las demás secuencias por lo que se decidió excluirlas del árbol (14d). En verano, las bacterias aisladas sólo pudieron ser amplificadas usando los oligonucleótidos Act235, donde todas las cepas salvo una se relacionan con bacterias pertenecientes al filo actinobacterias, la cepa Ap0903 se relaciona con una clona de bacteria no cultivable (Figura 14e). En otoño, época con el menor número de bacterias identificadas, se aprecia que con los oligonucleótidos específicos para Actinobacterias (14g), sólo se identificó una bacteria que se relaciona con el género *Brevibacterium*, mientras que con los oligonucleótidos 27F la mayoría de las bacterias identificadas se relacionan con cepas del género *Bacillus* (14e).

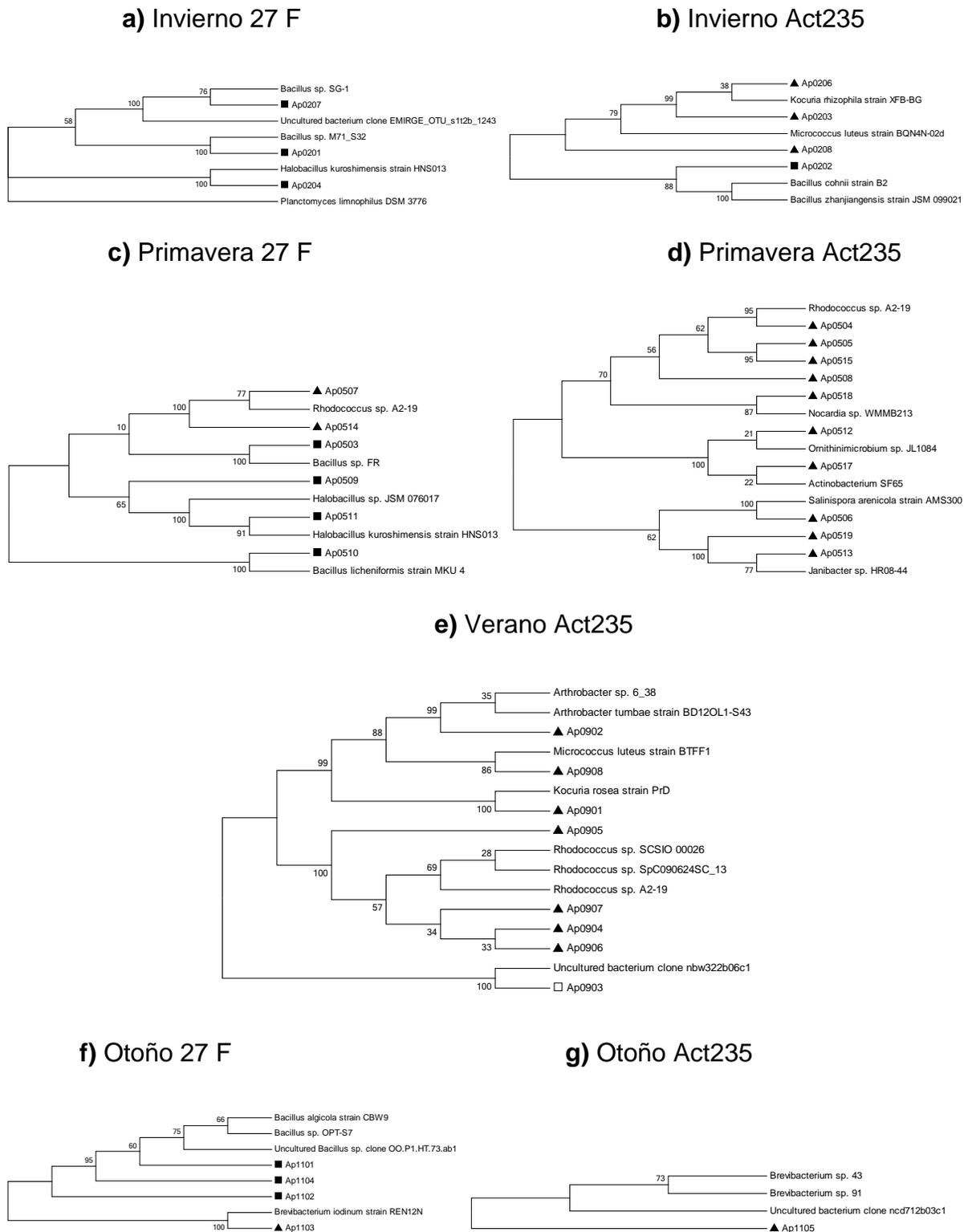


Figura 14. Árboles filogenéticos de las bacterias aisladas de la esponja *A. clathrata* y cepas de referencia en las diferentes épocas del año, con los dos diferentes pares de oligonucleótidos empleados 27F y Act235.

8.4. Ensayos de actividad antimicrobiana.

Actividad antibacteriana

En los bioensayos de actividad antibacteriana se probaron las 103 cepas aisladas en los diferentes muestreos frente a las cepas patógenas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. La mejor actividad antibacteriana se presentó frente a *P. aeruginosa*, ya que fue inhibida por 27 cepas. Siendo Ap0909 y Ap1105 (identificadas como *Brevibacterium* sp.) las que presentaron los mejores resultados con halos de inhibición de 19.83 mm y 19.66 mm respectivamente, mientras que la cepa Ap0518 (identificada como *Nocardia* sp.) fue la que registró el menor halo de inhibición (12 mm) frente a esta cepa (Tabla 7, Figura 16a). Frente a *Staphylococcus aureus* sólo cinco cepas Ap0504 (Identificada como *Rhodococcus* sp.), Ap0527, Ap0528, Ap0529 y Ap0530 fueron activas (Tabla 7, Figura 16c.), mientras que frente a *Escherichia coli* sólo una cepa (Ap0211), correspondiente al muestreo de invierno, fue activa (Tabla 7, Figura 16b). El extracto acuoso de las bacterias aisladas también fue probado frente a la cepa *Salmonella enterica*, sin embargo ninguno de las cepas presentaron actividad frente a esta bacteria patógena.

Actividad antifúngica

Los resultados de los ensayos de actividad de los extractos acuosos de las bacterias asociadas a la esponja frente a la levadura *Candida albicans*, mostraron que únicamente la cepa identificada como *Halobacillus* sp. presentó actividad con un halo de inhibición promedio de 25.7 mm (Tabla 7, Figura 15).

Tabla 7. Actividad antimicrobiana de las bacterias aisladas de *Aplysina clathrata*.

ID	Especie más cercana	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. entérica</i>	<i>C. albicans</i>
		Halo inhibición Prom $\pm\sigma$ (mm)				
Ap0201	<i>Bacillus</i> sp.	13.2 \pm 2.2				
Ap0202	<i>Bacillus cohnii</i>	14.2 \pm 0.2				
Ap0203	<i>Kocuria rhizophila</i>	14.8 \pm 0.2				
Ap0205	<i>Kocuria rhizophila</i>	15.7 \pm 2.4				
Ap0206	<i>Kocuria rhizophila</i>	15.2 \pm 0.2				
Ap0209	N.I.	17 \pm 2.6				
Ap0211	N.I.			7.8 \pm 0.2		
Ap0504	<i>Rhodococcus</i> sp.	13.7 \pm 0.7	13.3 \pm 1.5			
Ap0506	<i>Salinispora arenícola</i>	15 \pm 0.8				
Ap0509	<i>Halobacillus</i> sp.	14.8 \pm 0.7				25.7 \pm 1.2
Ap0510	<i>Bacillus licheniformis</i>	12.3 \pm 2.2				
Ap0511	<i>Halobacillus kuroshimensis</i>	10.2 \pm 0.7				
Ap0517	<i>Actinobacterium</i>	12.5 \pm 2.2				
Ap0518	<i>Nocardia</i> sp.	12 \pm 1				
Ap0520	N.I.	13.2 \pm 0.2				
Ap0522	N.I.	12.2 \pm 2.5				
Ap0523	N.I.	12.7 \pm 2.2				
Ap0524	N.I.		11 \pm 0.5			
Ap0525	N.I.		12.3 \pm 1.5			
Ap0526	N.I.		9.8 \pm 0.2			
Ap0527	N.I.		12.3 \pm 0.5			
Ap0905	<i>Rhodococcus</i> sp.	15.2 \pm 0.2				
Ap0907	<i>Rhodococcus</i> sp.	15.5 \pm 0.5				
Ap0908	<i>Micrococcus</i> sp.	15 \pm 0.8				
Ap0909	N.I.	19.8 \pm 1				
Ap0910	N.I.	14 \pm 1				
Ap1101	<i>Bacillus algicola</i>	13.8 \pm 0.2				
Ap1102	<i>Bacillus algicola</i>	16.5 \pm 1.3				
Ap1103	<i>Brevibacterium iodinum</i>	17 \pm 1.3				
Ap1104	Uncultured <i>Bacillus</i> sp.	15.3 \pm 0.5				
Ap1105	<i>Brevibacterium</i> sp.	19.7 \pm 0.7				
Ap1106	N.I.	15.7 \pm 2.9				
C.P.			12.7 \pm 0.5	10.2 \pm 0.2	30.5 \pm 0.8	

N.I. (No identificada), CP (Control positivo), -- (sin actividad)

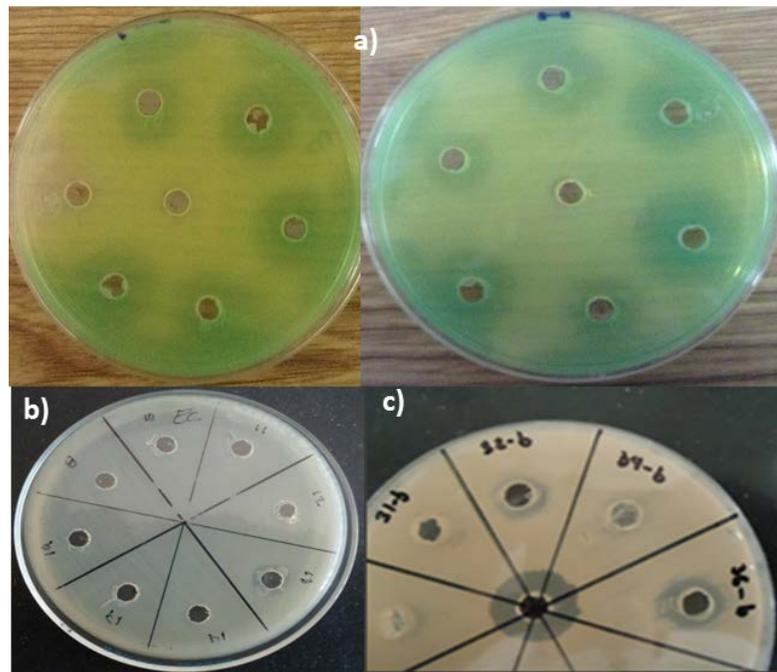


Figura 15. Halos de inhibición de crecimiento a) *Pseudomonas aeruginosa* b) *Escherichia coli* y c) *Staphylococcus aureus*.

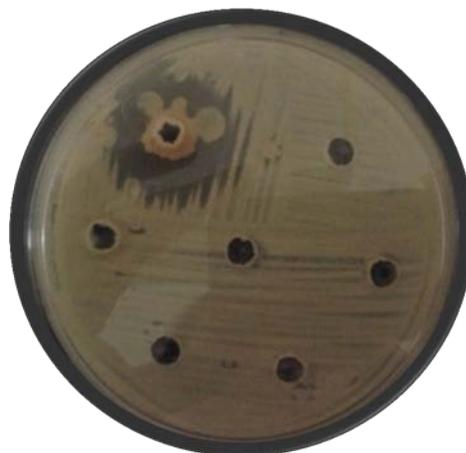


Figura 16. Actividad antifúngica de la cepa Ap0509 frente a *Candida albicans*.

8.5. Ensayos de actividad hemolítica.

En los ensayos de actividad hemolítica 11 extractos presentaron hemolisis, todos ellos a las 24 horas de incubación. Las cepas Ap0518, Ap0519 y Ap0520 presentaron una hemolisis de tipo α , la cual produce una coloración verde (Figura 18c, Tabla 9), mientras que las cepas Ap0201, Ap0209, Ap0506, Ap0509, Ap0510, Ap0517, Ap0521 y Ap0522 presentaron una hemolisis tipo β (Figura 18a, 18b, 18d, Tabla 9).

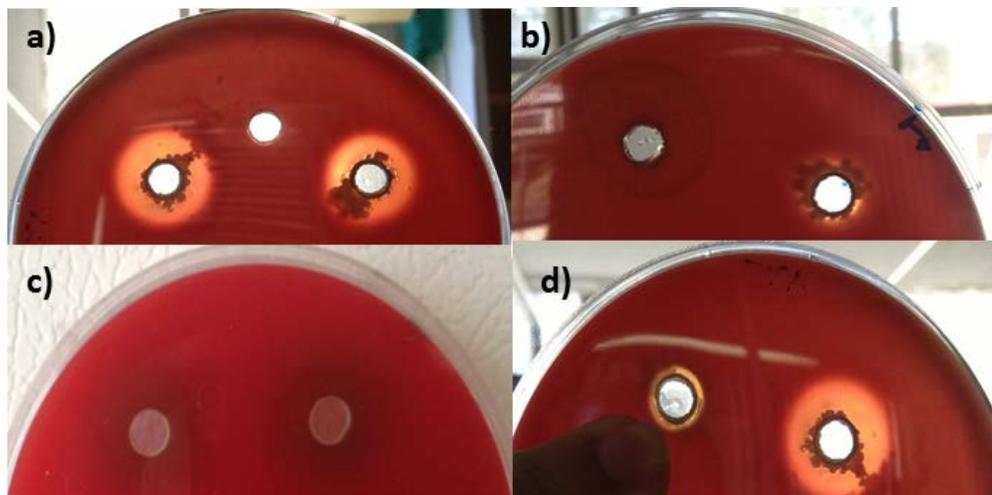


Figura 17. Actividad hemolítica de los extractos acuosos de las cepas aisladas de la esponja *A. clathrata*. a) Ap0510 y Ap0522, b) Ap0520, c) Ap0518 y Ap0519 y c) Ap0509 y Ap0517.

Tabla 8. Actividad hemolítica de los extractos acuosos de las cepas aisladas de la esponja *A. clathrata* con un tiempo de incubación de 24 h.

ID	Especie más cercana	Actividad	Tipo de Hemolisis
Ap0201	<i>Bacillus</i> sp.	++	β
Ap0209	N.I.	++	β
Ap0506	<i>Salinispora arenicola</i>	++	β
Ap0509	<i>Halobacillus</i> sp.	+	β
Ap0510	<i>Bacillus licheniformis</i>	++	β
Ap0517	Actinobacterium	++	β
Ap0518	<i>Nocardia</i> sp.	+	α
Ap0519	<i>Janibacter</i> sp.	+	α
Ap0520	Clona de bacteria no cultivable	+	α
Ap0521	N.I.	+	β
Ap0522	N.I.	++	B

+(5 a 10 mm) , ++ (11 a 15 mm)

8.6. Variación estacional de la actividad antimicrobiana y hemolítica.

Para analizar la variación temporal de la actividad antimicrobiana y hemolítica se hizo un comparativo entre el número de bacterias aisladas por época del año y aquellas que presentaron actividad frente a las diferentes bacterias patógenas. (Figura 19).

Las bacterias que presentaron actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa* estuvieron presentes a lo largo de todo el año, siendo en primavera cuando se presentó el mayor número de cepas (10) con actividad frente a esta bacteria patógena y la menor cantidad de cepas activas (5) se presentó en verano. Frente a *Escherichia coli* sólo una cepa correspondiente a invierno presentó inhibición, mientras que para *Staphylococcus aureus* fueron cinco cepas las que presentaron actividad, todas ellas correspondientes a primavera. Con el hongo *Candida albicans* la única cepa activa fue aislada en primavera (Figura 20).

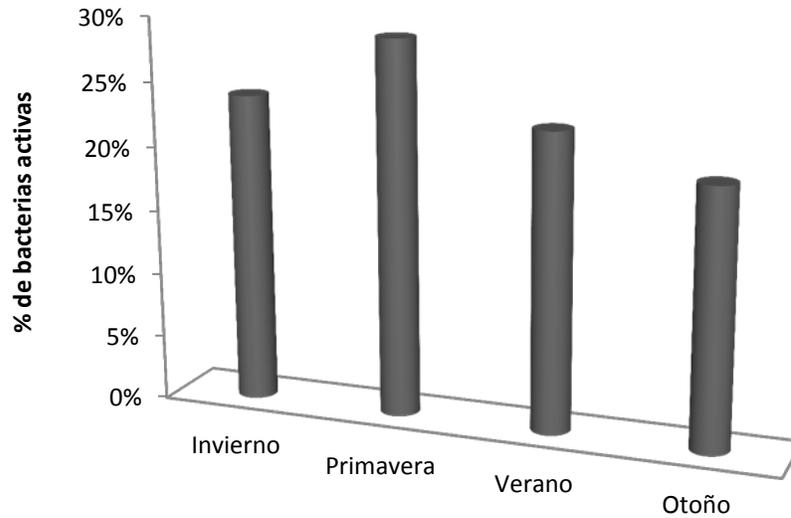


Figura 18. Variación temporal del porcentaje de bacterias aisladas de *A. clathrata* con actividad antimicrobiana frente a las diferentes bacterias patógenas.

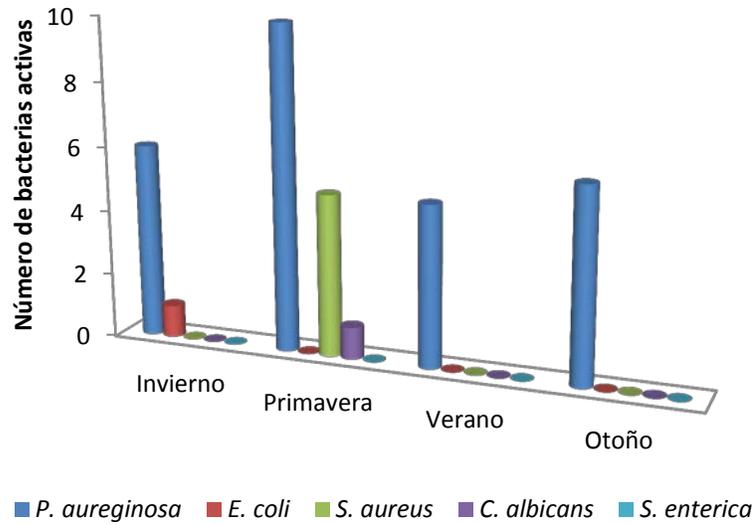


Figura 19. Variación temporal de la actividad de las bacterias aisladas de *A. clathrata* con actividad antimicrobiana.

La actividad hemolítica también presentó variación estacional ya que sólo algunos representantes de las épocas de invierno y primavera presentaron actividad de hemolisis, siendo primavera cuando se aisló el mayor número de bacterias con actividad (9), presentando además dos tipos de hemolisis (α y β), y en invierno sólo dos cepas presentaron actividad hemolítica (β) (Figura 21).

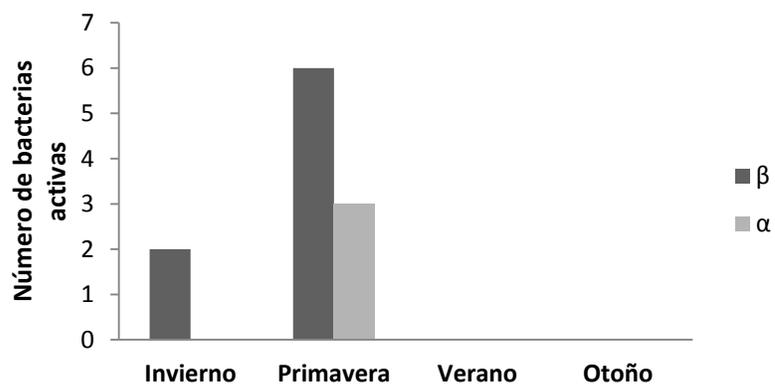


Figura 20. Variación temporal de la actividad hemolítica de las bacterias aisladas de *A. clathrata*.

9. DISCUSIÓN.

9.1. Aislamiento y caracterización morfológica de las bacterias Gram positivas asociadas a *Aplysina clathrata*.

Las esponjas representan un excelente nicho para el crecimiento de bacterias y diversos estudios han puesto de manifiesto que existe una alta diversidad de bacterias asociadas que aún no ha sido caracterizada (Friedrich *et al.* 1999; Raczkowski, 2010). La naturaleza de la asociación esponja-bacteria y la relevancia biotecnológica hace que las esponjas sean un sistema ideal para el estudio de diversidad bacteriana (Wang, 2008). Recientemente, las investigaciones se han centrado en microorganismos marinos para el descubrimiento de metabolitos secundarios que puedan ser empleados como fármacos, y se ha hecho evidente que las cepas de bacterias Gram positivas son una rica fuente de nuevas estructuras con prometedoras actividades antibacterianas (Blunt *et al.*, 2009), ya que los Bacilliales y Actinomicetales son los responsables de casi el 50% de los metabolitos bioactivos de origen microbiano descubiertos (Thomas *et al.*, 2010). Estudios como el presente trabajo son importantes porque proporciona una contribución al conocimiento de las bacterias Gram positivas cultivables asociadas a la esponja *A. clathrata*, cuya química y diversidad de biosíntesis puede ser investigada a futuro.

Se logró el aislamiento de un total de 103 cepas de bacterias Gram positivas a partir de la esponja *Aplysina clathrata*, en diferentes medios de cultivo y épocas del año 2012 (Figura 5). En ejemplares de *A. gerardogreeni* de la misma localidad se aislaron 167 cepas de bacterias de diversos grupos donde más del 90% de estos fueron bacterias Gram positivas, particularmente del phyla Firmicutes y tres cepas de actinobacterias del género *Micrococcus* (Águila-Ramírez, 2012). Esto pone de manifiesto que el género *Aplysina* presenta un gran potencial para el aislamiento de bacterias Gram positivas. Un estudio con la esponja *Mycale* sp. del Golfo de California, muestra que la mayoría de las bacterias aisladas también fueron Gram positivas, predominando los Firmicutes sobre las Actinobacterias (Parera, 2012). Si bien, no es posible comparar el número de cepas aisladas en estos trabajos debido a los tiempos de incubación y al uso de un sólo medio de cultivo que aunque rico en

nutrientes es generalista para bacterias heterótrofas, si es notorio que aun utilizando diferentes medios, las bacterias Gram positivas siempre fueron las más abundantes. Esta misma tendencia se ha observado en otros estudios con esponjas y sedimentos marinos donde se ha encontrado una alta proporción de bacterias Gram positivas (Lugioyo *et al.*, 2003; Jensen *et al.*, 2005; Gontang *et al.*, 2007).

A partir de diez esponjas de Puerto Rico se logró el aislamiento de un total de 180 actinomicetos utilizando tres medios de cultivos, dando lugar a la identificación de tres familias y siete géneros (Raczkowski, 2010). Mientras que a partir de once esponjas del Mediterráneo se aisló un total de 90 actinomicetos pertenecientes a 18 géneros diferentes, empleando ocho diferentes medios de cultivo (Abdelmonhsen *et al.*, 2010). En este trabajo a pesar de solo haber trabajado con una sola esponja se presentó una considerable diversidad en cuanto al número de representantes de cinco familias y nueve géneros de Actinobacterias.

La eficiencia de los medios de cultivo varía considerablemente dependiendo del grupo de bacterias que se desee aislar (Yang, 2013). El uso de medios de cultivos ricos en nutrientes puede explicar porque gran parte de bacterias Gram positivas no han sido cultivadas, ya que en otros estudios los medios de cultivo con concentraciones bajas de nutrientes mejoran el aislamiento inicial ya que ayudan a evitar la contaminación y proliferación de cepas de crecimiento rápido (Gotang, 2008). En este trabajo al utilizar diferentes tipos de medios de cultivo (enriquecidos y limitados en nutrientes) las placas pudieron ser incubadas hasta por 12 semanas sin presentar los problemas antes mencionados. Otro punto a destacar es que la complementación de los medios de cultivo con extracto acuoso de la esponja incrementa la posibilidad de aislar nuevas cepas de bacterias. Esto puede ser debido a que en el extracto se encuentren factores de crecimiento y nutrientes, además de representar un sustrato que puede ser colonizado por estos microorganismos (Taylor *et al.*, 2007; Kennedy *et al.*, 2009), y algunas bacterias asociadas que necesitan a la esponja para crecer (Bull y Stach, 2007; Yang, 2013). Lo cual se confirma con los resultados de este trabajo, dónde el medio que presentó el mayor número de

aislamientos de bacterias resultó ser Arginina complementado con el extracto acuoso de la esponja (Figura 6).

9.2. Identificación de las bacterias Gram positivas asociadas a *Aplysina clathrata*.

Aun cuando se emplearon medios selectivos para el aislamiento de bacterias Gram positivas, los cuales fueron complementados con un antibiótico (Ac. nalidíxico) para impedir que crecieran bacterias Gram negativas y un antifúngico (Mycostatina), al realizar las tinciones de Gram, si bien la mayoría fueron Gram positivas, se obtuvieron algunas cepas Gram negativas. Bajo esta selección se aislaron un total de 103 cepas que presentaron diferentes morfotipos.

De las 103 cepas seleccionadas originalmente, solo 41 pudieron ser secuenciadas. El análisis de las secuencias permitió ver que muchas de las bacterias, aun cuando presentaban características morfológicas diferentes, se relacionaron con una misma especie (Tabla 2). Esto podría explicarse a que la forma de una colonia varía dependiendo de ciertos factores, tales como la temperatura a la que están sometidos en el proceso de incubación, la edad del cultivo y la composición del medio (Rodríguez *et al.*, 2006).

La identificación de las 41 cepas se realizó mediante la secuenciación parcial del gen ADNr 16S, el uso de este gen ha revolucionado el campo de la ecología microbiana, ya que ha sido posible determinar posiciones filogenéticas de muestras ambientales de poblaciones bacterianas en el árbol evolutivo de la vida, independientemente de que puedan ser cultivadas y así poder seguir el rastro de ecosistemas complejos, como es el caso del existente entre la esponja-bacteria (Radwan *et al.*, 2010). El hecho de que no se hayan podido amplificar todas las muestras puede ser debido a que las bacterias Gram positivas al ser un grupo tan diverso y variado entre sí, es difícil diseñar un sistema de oligonucleótidos que logren amplificar todas las muestras por lo que es siempre recomendable usar más de un par de oligonucleótidos (Schäfer *et al.*, 2010). Es por eso que en este trabajo se emplearon dos pares diferentes de oligonucleótidos. Otro factor que puede explicar

por qué no se pudieron identificar todas las cepas aisladas es la alta homología genética que presentan determinados géneros bacterianos o un reciente cambio en su asignación taxonómica, que no permite realizar con el ARNr 16S una identificación a nivel de especie o de géneros. En estos casos, es necesario recurrir a otros genes dianas para realizar la asignación de especie (Bou *et al.*, 2011).

En este trabajo fueron 11 cepas las que presentaron porcentajes de identidad menores al 98.5%, esto podría llevar a la conclusión de que se tratan de especies nuevas ya que el porcentaje de divergencia del 1.5% entre secuencias donde se emplea el gen ARNr 16S indican que los valores menores al 98% hacen referencia a posibles nuevas especies (Bou *et al.*, 2011), sin embargo, son necesarios estudios más profundos para obtener una identificación más adecuada. Sobre todo cuando el aislamiento de bacterias Gram positivas que tienen el requerimiento de agua de mar para su crecimiento, como son el caso de varias especies de *Bacillus* (Ruger *et al.*, 2000; Gotang, 2008) y el actinomiceto *Salinospora*, sugieren que en el ambiente marino residen nuevas taxas (Maldonado *et al.*, 2005).

La identificación de Actinobacterias dentro de las esponjas ha resultado de gran interés debido a que muchos géneros pertenecientes a este phyla son prolíficos productores de compuestos bioactivos (Hentschel *et al.*, 2006). Un ejemplo es la cepa *Salinospora* que había sido aislada sólo de sedimentos marinos, sin embargo, Kim *et al.* (2005) la aíslan de la esponja *Pseudoceratina clavata*, mientras Yang (2013) logra aislar esta cepa de la esponja *Chalinula* sp. y en el presente estudio se reporta por primera vez el aislamiento de *S. arenicola* en una esponja del género *Aplysina*. También es importante mencionar que los actinomicetos *Janibacter* sp. y *Ornithinimicrobium* sp. son aislados por primera vez de esponjas de este género, aunque anteriormente cepas de estos géneros ya habían sido aislados de sedimentos marinos (Stach *et al.*, 2003). Los géneros *Rhodococcus*, *Kocuria*, *Nocardia*, *Micrococcus* y *Brevibacterium* han sido aislados frecuentemente de esponjas lo que sugiere que pueden ser componentes comunes asociados a estos invertebrados (Abdelmohsen *et al.*, 2010).

Es de particular interés que en el trabajo de Águila-Ramírez (2012) el grupo dominante haya sido Firmicutes, ya que en esponjas del género *Aplysina* se ha documentado que a pesar de que su presencia es constante en estas esponjas se encuentran en menor abundancia en comparación con otros grupos de bacterias. Tal es el caso del estudio de Hentschel *et al.* (2002) que reporta que dentro del grupo de bacterias Gram positivas dominantes son las Actinobacterias, lo cual concuerda con lo observado en este estudio con *A. clathrata*.

Dentro de los Firmicutes, el género dominante fue *Bacillus*, lo cual también fue observado en otros trabajos con esponjas del género *Aplysina* (Hentschel *et al.*, 2001; Águila-Ramírez, 2012) y de otras esponjas como *Mycale* sp. (Parera, 2012), *Dysidea avara*, *Craniella australiensis*, *Stelletta tenuis*, (Li *et al.*, 2007), *Myxilla incrustans*, *Haliclona rufescens* y *Halichondria panicea* (Lee *et al.*, 2009).

Un hecho interesante es que varios géneros de la familia Bacilliae que fueron aislados en el presente trabajo presentaron porcentajes de identidad bajos (<95%) al compararlos con secuencias conocidas del GenBank, lo cual podría poner de manifiesto que hay una considerable diversidad de nuevas bacterias dentro de esta familia que pueden ser aisladas de ambientes marinos (Gotang *et al.*, 2007; Gotang, 2008).

Si bien el ambiente marino es propicio para el aislamiento de nuevas bacterias, no todas las bacterias aisladas tiene un origen marino y se habla de que pudieran haberse originado en ambientes terrestres, está documentado que algunos actinomicetos terrestres tienen una alta tolerancia a medios salinos y son capaces de crear vesículas de gas que les permiten hacer grandes viajes cuando son transportados por ríos hacia el océano (Yang, 2013). Estas condiciones hacen que en muchos casos resulte difícil determinar si son autóctonos del ambiente marino o si son verdaderos simbioses de las esponjas (Jensen *et al.*, 1991).

Las bacterias marinas Gram positivas, al igual que su contraparte terrestre, pueden tener un papel importante en la descomposición de materia orgánica recalcitrante y por lo tanto en ciclos biogeoquímicos en el océano. Incluso se ha

documentado que estas bacterias en forma de esporas, poseen la capacidad de afectar el ambiente químico circundante debido a su capacidad para oxidar metales (Gotang, 2008). El papel ecológico que juegan los actinomicetos en las esponjas marinas es aún desconocido, sin embargo, se ha propuesto su participación en el ciclo biogeoquímico del fósforo, solubilizando los fosfatos en los procesos de desfosforilación enzimática para hacerlos disponibles para la esponja hospedera (Sabarathnam, 2010).

9.3. Variación estacional de las bacterias Gram positivas asociadas a la esponja *Aplysina clathrata*.

Resultó evidente que las bacterias Gram positivas cultivables de la esponja *A. clathrata* presentaron una variación estacional tanto en el número de cepas aisladas como en la diversidad de especies que se presentan. Por lo que las comunidades bacterianas asociadas a esta esponja no son estables a lo largo del tiempo, al menos en el nivel de resolución alcanzado en este estudio. La variabilidad estacional de bacterias asociadas está determinada por diversos factores bióticos y abióticos de cada época del año, así factores como la temperatura, salinidad, oxígeno, pH, corrientes, comunidades bacterianas del agua de mar circundante y la presencia o ausencia de epibiontes pueden modificar la flora bacteriana presente en la esponja (Osgood & Boylen, 1990; Thakur & Anil, 2000; Wichels *et al.*, 2010).

En este trabajo la mayor cantidad de bacterias Gram positivas asociadas a *A. clathrata* se presentó en primavera cuando la temperatura del agua de mar fue de 26 °C. Esto coincide con lo observado para *A. gerardogreeni* de la misma localidad de estudio, donde la mayor cantidad de bacterias aisladas fue en invierno y primavera (Aguila-Ramírez, 2012). En otras localidades y esponjas de diferentes géneros también se ha observado que en los meses de primavera se obtiene una mayor cantidad de bacterias asociadas (Bakus *et al.*, 1985; Ramaiah *et al.*, 1996; Thakur & Anil, 2000).

En el caso específico de las Actinobacterias, la mayor diversidad se presentó en primavera (10 especies) y verano (8 especies), al igual que en otros trabajos en los que se ha observado la mayor abundancia en épocas cálidas (Klausen *et al.*, 2006; Ghanem *et al.*, 2008; Yoshida *et al.*, 2008). El único género que sólo se presentó en una época del año (otoño) fue *Brevibacterium*, a diferencia de otras esponjas en las que es uno de los géneros más representativos dentro de las actinobacterias asociadas (Abdelmohsen *et al.*, 2010).

Con respecto a los Firmicutes, la mayor diversidad se presentó en primavera, mientras que en verano no se observó la presencia de este grupo, y fueron las actinobacterias las dominantes. Dentro de los Firmicutes se ha reportado que el género *Bacillus* constituyen uno de los grupos dominantes en la flora bacteriana de esponjas (Li *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009) y en *Aplysina gerardogreeni* de Punta Arena de la Ventana este género se encontró asociado a la esponja a lo largo de las diferentes épocas del año (Águila-Ramírez, 2012). De igual forma en este trabajo se observó que *Bacillus* fue el único que se presentó en tres de las temporadas de muestreo, mostrando ausencia sólo en verano, lo que sugiere que estas bacterias viven en relación simbiótica con este género en Punta Arena de la Ventana. Sin embargo, aún se requieren de más estudios que permitan conocer la relación de este grupo de bacterias con la esponja, así como los factores que pudieran intervenir en la presencia o ausencia dentro del organismo hospedero.

9.4. Actividad antimicrobiana de las bacterias Gram positivas aisladas de *Aplysina clathrata*.

Los antibióticos son definidos como sustancias que son producidas por microorganismos que son antagonistas para el crecimiento o supervivencia de otros microbios. Las bacterias son conocidas por producir sustancias bioactivas en los ambientes marinos, usualmente para protegerse de depredadores (Devi *et al.*, 2011).

Se probó el extracto acuoso de las 103 cepas aisladas de la esponja frente a cepas de bacterias patógenas para el hombre (*E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*) y el

hongo *Candida albicans*, obteniendo que el 31% de las bacterias presentaron actividad frente a estas bacterias patógenas. El 5% de los extractos presentaron actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*, el 26% fueron activas frente a *P. aeruginosa*, mientras que frente a *E. coli* y *C. albicans* sólo el 1% del total de cepas presentó actividad. Es importante mencionar que los halos de inhibición presentados frente a *E. coli* y *S. aureus* fueron menores a los reportados en la literatura (Águila-Ramírez, 2012). Romanenko *et al.* (2008) aíslan bacterias marinas asociadas a moluscos, observando que la bacteria *B. licheniformis* presentó actividad frente a *S. aureus* pero no frente a *P. aeruginosa*, caso contrario se observa en el presente trabajo dónde la cepa Ap0510 identificada como *B. licheniformis* no presentó actividad frente a *S. aureus* pero si frente a *P. aeruginosa*, En los trabajos con las esponjas *Mycale* sp. (Parera, 2012) y *A. gerardogreeni* (Águila-Ramírez, 2012) donde también aíslan cepas de *B. licheniformis*, muestran que esta bacteria también fue activa frente a *S. aureus* y *E. coli*, lo cual no se observó en el presente trabajo. La diferencia en la actividad con estos trabajos puede ser asociada a que la actividad antimicrobiana se pierde durante las resiembras periódicas para la obtención de los cultivos (Muscholl-Silberhorn *et al.*, 2008).

Abdelmohsen *et al.* (2010) prueban la actividad del extracto crudo del actinomiceto *Rhodococcus* sp. aislado de esponjas, el cual presenta actividad frente a *S. aureus* con un halo de inhibición de 12 mm, comparable con el encontrado en este trabajo que fue de 13.3 mm (cepa Ap0504).

La cepa Ap0509 identificada como *Halobacillus* sp., aunque con bajo porcentaje de identidad (84%), fue la única bacteria que presentó actividad frente a *C. albicans* y además actividad hemolítica. En cepas del género *Bacillus*, la presencia de ambas actividades es un indicador de la producción de un lipopéptido de la clase iturina o surfactina pero también se ha documentado en otros géneros de la familia Bacillaceae (Thomas *et al.*, 2010).

Al comparar los métodos de siembra directa y siembra en pozo de la actividad hemolítica, sólo la cepa Ap0509 presentó actividad en los dos métodos con diferencia de la presencia de hemólisis en cuanto al periodo de incubación. Ha sido

reportado que la técnica de siembra en pozo contribuye a incrementar la actividad hemolítica la cual puede ser atribuida a un mayor volumen de suspensión bacteriana. Esta técnica es de mayor utilidad práctica en la detección de la actividad hemolítica ya que permite una lectura más fácil, reproducible y con menor tiempo de incubación que el requerido por siembra directa (Ruíz *et al.*, 2006). La actividad hemolítica se reporta como un primer estudio para probar si los microorganismos presentan actividad surfactante (Loganathan *et al.*, 2010). Los surfactantes tienen propiedades características tales como reducir tensiones superficiales, aumento de solubilidad, poder de detergencia, capacidad de formación de espuma y se aplica como adhesivos, floculantes y humectantes. Otros estudios reportan sus aplicaciones en la industria alimenticia, cosmética y farmacéutica.

10. CONCLUSIONES

A partir de la esponja *Aplysina clathrata* de la localidad de Punta Arena de la Ventana, B.C.S., se aislaron un total de 103 cepas Gram positivas que presentaron morfologías coloniales distintas, poniendo de manifiesto la gran diversidad de este grupo de bacterias. Sin embargo, únicamente 41 cepas pudieron ser secuenciadas mediante la amplificación parcial del gen ADNr 16S, por lo que es necesario el empleo de un mayor sistema de oligonucleótidos que permitan su identificación.

Dentro de las bacterias identificadas, se tuvieron representantes de seis familias de bacterias Gram positivas y 11 géneros distintos. La mayoría pertenecen al grupo de las Actinobacterias, el cual dentro de las bacterias Gram positivas se ha caracterizado por su dominancia en las comunidades bacterianas asociadas a esponjas. Los géneros mejor representados fueron *Rhodococcus* en Actinobacterias y *Bacillus* en Firmicutes, el primero aislado con 10 representantes y el segundo con siete representantes.

Utilizar diferentes medios de cultivo incrementa el número y diversidad de bacterias cultivables. En este trabajo de los seis medios de cultivo utilizados, el que estuvo suplementado con arginina y extracto acuoso de la esponja, fue el que presentó el mayor número de aislamiento de bacterias Gram positivas, seguido de su similar pero sin el extracto de esponja.

Las bacterias Gram positivas cultivables de la esponja *A. clathrata* presentaron una variación estacional tanto en el número de cepas aisladas como en la diversidad de especies que se presentan. El mayor número de bacterias se presentó en primavera, aportando el 42.7% del total en las diferentes épocas del año, mientras que en otoño se tiene el menor número de bacterias asociadas. Por lo que estas bacterias asociadas a esta esponja no permanecen estables a lo largo del tiempo, al menos en el nivel de resolución alcanzado en este estudio.

En cuanto a la actividad biológica de las bacterias, el 33% presentaron actividad. La mejor actividad registrada fue frente a *Pseudomonas aeruginosa* con 27 cepas que presentaron inhibición. El 4.8% fueron activas frente a *S. aureus* mientras que sólo una bacteria fue activa frente a *E. coli* y otra frente a *C. albicans*. Once bacterias presentaron actividad hemolítica, presentando hemolisis tipo α y β .

La actividad antibacteriana también presentó una variación estacional, ya que las cepas que fueron activas frente a *S. aureus* correspondieron al muestreo de primavera, mientras que la única cepa que presentó inhibición frente a *E. coli* fue del muestreo de invierno. Frente a *P. aeruginosa* representantes de los diferentes muestreos tuvieron actividad contra esta cepa patógena. La actividad hemolítica solo la presentaron las cepas correspondientes a los muestreos de invierno y primavera.

El presente trabajo contribuye a un mejor conocimiento de las bacterias asociadas a esponjas del género *Aplysina* en el área de Punta Arena de la Ventana, B.C.S. una zona de gran diversidad biológica que ha sido poco estudiada desde este punto de vista. Además de que revela el potencial activo que presentan estas bacterias Gram positivas que pueden ser utilizadas con fines biotecnológicos.

11. LITERATURA CITADA

- Águila-Ramírez, R. N., C. J. Hernández-Guerrero & B. González-Acosta. 2011. Caracterización y bioactividad de las bacterias asociadas a la esponja *Aplysina gerardogreeni* de un arrecife rocoso del Golfo de California. Resúmenes del XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Queretaro, Qro.
- Águila-Ramírez, R. N. 2012. Caracterización y bioactividad de bacterias asociadas a la esponja *Aplysina gerardogreeni* del Golfo de California. Tesis de Doctorado. CICIMAR-IPN, La Paz, México. 165 p.
- Abdelmohsen, U. R., S. M. Pimentel-Elardo, A. Hanora, M. Radwan, S. H. Abou-El-Ela, S. Ahmed & U. Hentschel. 2010. Isolation, phylogenetic analysis and anti-infective activity screening of marine sponge-associated actinomycetes. *Marine Drugs*, 8: 399 – 412.
- Anand, T. P., A. W. Bhat, Y. S. Shouche, U. Roy, J. Siddharth & S. P. Sarma. 2006. Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off coast of South East India. *Microbiological research*, 161: 252 – 262.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith & K. Struhl. 2002. Short protocols in molecular biology: A compendium of methods from current protocols in molecular biology. 5th Ed. John Wiley and Sons, Inc. pp
- Blunt, J. W., B. R. Copp, M. H. G. Munro, P. T. Northcote & M. R. Prinsep. 2003. Marine natural products. *Natural Products Reports*, 20: 1 – 48.
- Blunt, J. W., B. R. Copp, W. P. Hu., M. H. G. Munro, P. T. Northcote & M. R. Prinsep. 2009. *Marine natural products. Natural Products Reports*, 26: 170 – 244.
- Bou, G., A. Fernández-Olmos, C. García, J. A. Sáez-Nieto & S. Valdezate. 2011. Métodos de identificación bacteria en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infec Microbiol Clin.*, 29(8): 601 – 608.
- Bull, A. T. & J. E. M. Stach. 2007. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *TRENDS in Microbiology*, 15(11): doi:10.1016/j.tim.2007.10.004
- Bultel-Poncé, V. C. Debitus, J. Berge, C. Cerceau & M. Guyot. 1998. Metabolites from the sponge associated bacterium *Micrococcus luteus*. *J. Mar. Biotechnol.*, 6: 233 – 236.

- Burja, A. M & R. T. Hill. 2001. Microbial symbionts of the Australian Great Barrier Reef sponge *Candidaspongia flabellate*. *Hydrobiologia*, 461:41 – 47.
- Correa-Gómez, J. 2012. Evaluación de péptidos sintéticos sobre bacterias, levaduras y mohos. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Colombia. 59 p.
- Cruz-Barraza, J. A., J. L. Carballo, A. Rocha-Olivares, H. Ehrlich & M. Hog. 2012. Integrative Taxonomy and Molecular Phylogeny of Genus *Aplysina* (Demospongiae: Verongida) from Mexican Pacific. *PLoS ONE*, 7(8): e42049. doi:10.1371/journal.pone.0042049.
- De la Calle, F. 2007. Fármacos de origen Marino. *Treballs de la SCB.*, 58: 141–155.
- De la Rosa, S. & M. M. Gamboa. 2004. Microorganismos acuáticos: Una farmacia por visitar. *Ciencia Ergo Sum*, 11(2): 186 – 190.
- Delcour, A. H. 2009. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et biophysica acta*, 1794(5): 808 – 16.
- Demain, A. L. 2013. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *J Ind Microbial Biotechnol.*, DOI 10.1007/s10295-013-1325-z
- Devi, N. K. A., R. Rajendran & K. Sundaram. 2011. Isolation and characterization of bioactive compounds from marine bacteria. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 2(1): 59 – 64.
- Dreser, A., V. J Wirtz, K. K. Corbett & G. Echániz. 2008. Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. *Salud Pública Mex.*, 50(4): 480 – 487.
- Dunlap, W. C., C. N. Battershill, C. H. Liptrot, R. E. Cobb, D. G. Bourne, M. Jaspars, P. F. Long & D. J. Newman. 2007. Biomedicinals from the phytosymbionts of marine invertebrates: A molecular approach. *Methods*, 42: 358 – 376.
- EIAhwany, A. M. D., H. A. Ghozlan, H. A. ElSharif & S. A. Sabry. 2013. Phylogenetic diversity and antimicrobial activity of marine bacteria associated with the soft coral *Sarcophyton glaucum*. *J. Basic Microbiol.*, 53: 1 – 9.
- Farris, M. H. & J. B. Olson. 2007. Detection of actinobacteria cultivated from environmental samples reveals bias in universal primers. *Letters in Applied Microbiology*, 45: 376 – 381.

- Faulkner, D. J., M. K. Harper, M. G. Haygood, C. E. Salomon & E. W. Schmidt. 2000. Symbiotic bacteria in sponges: sources of bioactive substances. *Drugs from the Sea*, DOI: 10.1159/000062486.
- Fenical, W. & P. R. Jensen. 2006. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Natural Chemical Biology*, 2: 666 – 673.
- Flemmer, B., J. Kennedy, L. M. Margassery, J. P. Morrisey, F. O’Gara & A. D. W. Dobson. 2012. Diversity and antimicrobial activities of microbes from two Irish marine sponges, *Suberites carnosus* and *Leucosolenia* sp. *J. Appl. Microbiol.*, 112: 289 – 301.
- Friedrich, A. B., H. Merkert, T. Fendert, J. Hacker, P. Proksch & U. Hentschel. 1999. Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina cavernicola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Mar. Biol.*, 134: 461 – 470.
- Gándara-Zamudio, A. 2011. Actividad antibacteriana y citotóxica de diferentes morfologías de la esponja *Aplysina gerardogreeni* de Punta Arena de la Ventana, B. C. S., México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur, México. 62 p.
- Gandhimathi, R., M. Arunkumar, J. Selvin, T. Thangavelu, S. Sivaramakrishnan, G.S. Kiran, S. Shanmughapriya & N. Natarajaseenivasan. 2008. Antimicrobial potential of sponge associated marine actinomycetes. *Journal de Mycologie Médiclae*, 18: 16 – 22.
- Gandhimathi, R., G. Seghal Kiran, T. A. Hema, J. Selvin, T. R. Raviji & S. Shanmughapriya. 2009. Production and characterization of lipopeptide biosurfactant by a sponge-associated marine actinomycetes *Nocardiopsis alba* MSA10. *Bioprocess Biosyst Eng.*, 32: 825 – 835.
- Ghanem, N. B., S. A. Sabry, M. Z. El Sherif & G. A. A. El-Ela. 2000. Isolation and enumeration of marine actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 46: 105 – 111.
- Gontang, E. A., W. Fenical & P. R. Jensen. 2007. Phylogenetic diversity of Gram-Positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(10): 3272 – 3282.

- Gontang, E. A. 2008. Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria and their secondary metabolite genes. Tesis de Doctorado. Universidad de California, Estados Unidos, 163 p.
- Groll, M., R. Huber & B. C. Potts. 2006. Crystal structure of salinosporamide A (NPI-0052) and B (NPI-0047) in complex with the 20S proteasome reveal important consequences of beta-lactone ring opening and a mechanism for irreversible binding. *J. Am. Chem. Soc.*, 128: 5136 – 5141.
- Han, Y. B. Yang, F. Zhang, X. Miao & Z. Li. 2009. Characterization of antifungal chitinase from marine *Streptomyces* sp. DA11 associated with south China sea sponge *Craniella australiensis*. *Mar. Biotechnol.*, 11: 132 – 140.
- Hentschel, U., M. Schmid, M. Wagner, L. Fieseler, C. Gernert & J. Hacker. 2001. Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiology Ecology*, 35: 305 – 312.
- Hentschel, U, J. Hopke, M. Horn, A. B. Friedrich, M. Wagner, J. Hacker & B. S. Moore. 2002. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl Environ Microbiol.*, 68: 4431 – 4440.
- Hentschel, U., K. M. Usher & M. W. Taylor. 2006. Marine sponge microbial fermenters. *FEMS Microbial Ecol.*, 55: 167 – 177.
- Hill, R. T. 2004. Microbes from marine sponges: a treasure trove of biodiversity for natural products discovery, 177-190. *En: Bull A.T. (Ed.). Microbial diversity and bioprospecting*. ASM Press, Washington.
- Jensen P.R., R. Dwight, W. Fenical. 1991. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Applied and environmental microbiology*, 57: 1102 – 8.
- Jensen, P. R. & W. Fenical. 1995. The relative abundance and seawater requirements of Gram-positive bacteria in near-shore tropical marine samples. *Microb. Ecol.*, 29(3): 249 – 257.
- Jensen, P. R., T. J. Mincer, P. G. Williams & W. Fenical. 2005. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87: 43 – 48.

- Jiang, S., Sun, W., Chen, M., Dai, S., Zhang, L., Liu, Y., Lee, K. J. & X. Li. 2007. Diversity of culturable actinobacteria isolated from marine sponge *Haliclona* sp. *Antonie van Leeuwenhoek*, 92:405 – 416.
- Kennedy, J., P. Baker, C. Piper, P. D. Cotter, M. Walsh, M. J. Mooij, M. B. Bourke, M. C. Rea, P. M. O'Connor, R. P. Ross, C. Hill, F. O'Gara, J. R. Marchesi & A. W. Dobson. 2009. Isolation and analysis of bacteria from antimicrobial activities from the marine sponge *Haliclona simulans* collected from Irish Waters. *Mar. Biotechnol.*, 11: 384 – 396.
- Kim, T. K., M. J. Garson & J. A. Fuerst. 2005. Marine actinomycetes related to the 'Salinospora' group from the Great Barrier Reef sponge *Pseudoceratina clavata*. *Environ Microbiol.*, 7: 509 – 518.
- Klausen, C., Nicolaisen, M. H., Strobel, B. W., Warnecke, F., Nielsen, J.L. & N. O. G. Jorgense. 2006. Abundance of actinobacteria and production of geosmin and 2-methylisoborneol in Danish streams and fish ponds. *FEMS Microbiology Ecology*, 52(2): 265 – 278.
- Lee, O. O., Y. H. Wong & P. Y. Qian. 2009. Inter-and intraspecific variations of bacterial communities associated with Marine sponges from San Juan Island, Washington. *Appl Environ Microbiol.*, 75(11): 3513 – 3521.
- Lee, O., Y. Wang, J. Yang, F. F. Lafi, A. Al-Sawailem & P. Y. Qian. 2011. Pyrosequencing reveals highly diverse and species specific microbial communities in sponges from the Red Sea. *ISME J.* 5: 650 – 664.
- León, J., J. J. Aponte, R. Rojas, D. L. Cuadra, N. Ayala, G. Tomás, & M. Guerrero. 2011. Estudio de actinomicetos marinos aislados de la costa del Perú su actividad antibacteriana frente *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes y *Enterococcus faecalis* vancomicina resistentes. *Rev. Peru Med Exp Salud Pública*, 28(2): 237 – 46.
- Li, Z. Y. & Y. Liu. 2006. Marine sponge *Craniella australiensis*-associated bacterial diversity revelation based on 16S rDNA library and biologically active Actinomycetes screening, phylogenetic analysis. *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*, 43: 410 – 416.

- Li, Z., I. He & X. Miao. 2007. Cultivable bacterial community from South China Sea Sponge as revealed by DGGE fingerprinting and 16S rDNA phylogenetic analysis. *Current Microbiology*, 7: 113 – 129.
- Liu, R., C. B. Cui, L. Duan, Q. Gu, W. M. Zhu. 2005. Potent in vitro anticancer activity of metacycloprodigiosin and undecylprodigiosin from a sponge derived actinomycete *Saccharopolyspora* sp. nov. *Arch Pharm Res.*, 28: 1341 – 1344.
- Loganathan, K., K. Gaurav & V. B. R. Kokati. 2010. Comparison of methods and screening of biosurfactant producing marine actinobacteria isolated from Nicobar marine sediment. *The ILOAB Journal.*, 1:(2): 34 – 38.
- Lu, X. L., Q. Z. XU, X. Y. Liu, X. Cao, K. Y. Ni & B. H. Jiao. 2008. Marine drugs - Macrolactins. *Chemistry & Biodiversity*, 5: 1669 – 1674.
- Lugioyo, G. 2003. Distribución, relaciones tróficas y diversidad del bacterioplancton de las aguas oceánicas de Cuba. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio ambiente. Instituto de Oceanología, La Habana, Cuba. 127 p.
- Maldonado, L. A., W. Fenical, P. R. Jensen, C. A. Kauffman, T. J. Mincer, A. C. Ward, A. T. Bull & M. Goodfellow. 2005. *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55: 1759 – 1766.
- Mehbub, M. F. & A. K. M. Rohul-Amin. 2012. Isolation and identification of actinobacteria from two south australian marine sponges *Aplysilla rosea* and *Aplysina* sp. *Bangladesh Research Publications Journal*, 7(4): 345 – 354.
- Mincer, T. J., P. R. Jensen, C. A. Kauffman, & W. Fenical. 2002. Widespread and persistent Populations of a Major New Actinomycete Taxon in Ocean Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10): 5005 – 11.
- Murphy, B. T., P. R. Jensen & W. Fenical. 2012. The chemistry of marine bacteria. *Handbook of Marine Natural Products*, DOI 10.1007/978-90-481-3834-0_3.
- Muscholl-Silberhorn, A., V. Thiel & J. Imhoff. 2008. Abundance and bioactivity of cultured sponge-associated bacteria from the Mediterranean Sea. *Microb. Ecol.*, 55: 94 – 106.

- Olson, J. B., D. K. Harmody, A. K. Bej., & P. J. McCarthy. 2007. *Tsukamurella spongiae* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a deep-water marine sponge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 1478 – 1481.
- Osgood, M. P. & C. W. Boylen. 1990. Seasonal variations in bacterial communities in Adirondack streams exhibiting pH gradients. *Microbial Ecol.*, 20: 211 – 230.
- Pabel, C.T. J. Vater, C. Wilde, P. Franke, J. Hofemeister, B. Adler, G. Bringmann, J. Hacker, U. Hentschel. 2003. Antimicrobial activities and Matrix- Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of *Bacillus* Isolates from the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Mar. Biotechnol.*, 5: 424 – 434.
- Parera-Valadez, Y. 2012. Identificación y actividad antibacteriana de bacterias cultivables asociadas a la esponja *Mycale* sp. de la Bahía de la Paz, B. C. S., México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur, México. 76 p.
- Pettit G. R., J. C. Knight, D. I. Herald, R. K. Pettit, F. Hogan, V. J. Mukku, J. S. Hamblin, M. J. Dodson & J. C. Chapuis. 2009. Antineoplastic agents. 570. Isolation and structure elucidation of bacillistatins 1 and 2 from a marine *Bacillus silvestris*. *J. Nat. Prod.*, 72: 366 – 371.
- Phelan, R. W., J. A. O'Halloran, J. Kennedy, J.P. Morrissey, A.D.W. Dobson, F. O'Gara & T.M. Barbosa. 2011. Diversity and bioactive potential of endospore-forming bacteria cultured from the marine sponge *Haliclona simulans*. *Journal of Applied Microbiology*, doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05173.x
- Pimentel-Elardo, S. M., S. Kozytska, T. S. Bugni, C. M. Ireland, H. Moll & U. Hentschel. 2010. Anti-Parasitic Compounds from *Streptomyces* sp. Strains Isolated from Mediterranean Sponges. *Mar. Drugs*, 8: 373 – 380.
- Raczkowski, J. V. 2010. Biodiversity of actinomycetes associated with Caribbean sponges of Puerto Rico, and their metabolic profiles. Tesis de Maestría. Universidad del Norte de Carolina, Estados Unidos. 137 p.
- Radjasa, O.K., T. Martens, H. Grossart, T. Brinkhoff, A. Sabdono & M. Simmon. 2007. Antagonistic activity of a marine bacterium *Pseudoalteromonas*

- luteoviolacea* TAB4.2 associated with coral *Acropora* sp. *J. Biol. Sci.*, 7: 239 – 246.
- Radwan, M., A. Hanora, J. Zan, N. M. Mohamed, D. M. Abo-Elmatty, S. H. Abou-El-Ela & R. T. Hill. 2010. Bacterial community analyses of two red sea sponges. *Mar Biotechnol.*, 12: 350 – 360.
- Ramaiah, N., S. Raghukumar & M. Gaus. 1996. Bacterial abundance and production in the central and eastern Arabian sea. *Curr. Sci.*, 71: 878 – 882.
- Ramm, W., W. Schatton, I. Wagner-Dobler, V. Wray, M. Nimtz, H. Tokuda, F. Enjyo, H. Nishino, W. Beil, R. Heckmann, V. Lurtz & S. Lang. 2004. Diglycosyl-glycerolipids from the marine sponge-associated *Bacillus pumilus* strain AAS3: their production, enzymatic modification and properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64: 497 – 504.
- Rodríguez, E., M. Gamboa, F. Hernández & J. García. 2006. Bacteriología general: principios y prácticas de laboratorio. Editorial EUCR, Costa Rica. 370 p.
- Romanenko, L. A., M. Uchino, N. I. Kalinovskaya & V. V. Mikhailov. 2008. Isolation, phylogenetic analysis and screening of marine mollusc-associated bacteria for antimicrobial, hemolytic and surface activities. *Microbiol Res.*, 163(6): 633 – 44.
- Ruger, H. J., D. Fritze & C. Sproer. 2000. New psychrophilic and psychrotolerant *Bacillus marinus* strains from tropical and polar deep-sea sediments and emended description of the species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 50:1305 – 1313.
- Sabarathnam, B., A. Manilal, S. Sujith, S. Seghal, J. Selvin, A. Thomas & R. Ravji. 2010. Role of sponge associated actinomycetes in the marine phosphorous biogeochemical cycles. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science*, 8(3): 253 – 256.
- Sacristán-Soriano, O., B. Banaigs, E. O. Casamayor, & M. A. Becerro. 2011. Exploring the Links between Natural Products and Bacterial Assemblages in the Sponge *Aplysina aerophoba*. *Applied and environmental microbiology*, 77(3): 862 – 870.
- Sambrook, J. & D. W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

- Santos, O. C. S., P. V. M. L. Pontes, J. F. M. Santos, G. Muricy, M. Giambiagi-deMarval & M. S. Laport. 2010. Isolation, characterization and phylogeny of sponge-associated bacteria with antimicrobial activities from Brazil. *Research in Microbiology*, 161: 604 – 612.
- Santos-Gandelman, J. F., O. C. S. Santos, P. V. M. Pontes, C. L. Andrade, E. Korenblum, G. Muriey, M. Giambiagi-deMarval & M. S. Laport. 2013. Characterization of cultivable bacteria from Brazilian sponges. *Mar Biotechnol.*, DOI 10.1007/s10126-013-9518-z.
- Schäfer, J., U. Jäckel & P. Kämpfer. 2010. Development of a new PCR primer system for selective amplification of Actinobacteria. *FEMS Microbiol Lett.*, 311: 103 – 112.
- Selvin, J., S. Joseph, K. R. T. Asha, W. A. Manjusha, V. S. Sangeetha, D. M. Jayaseema, M. C. Antony & A. J. D. Vinitha. 2004. Antibacterial potential of antagonistic *Streptomyces* sp. Isolated from marine sponge *Dendrilla nigra*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 50: 117 – 122.
- Selvin, J., R. Gandhimathi, G. S. Kiran, S. S. Priya, T. R. Ravji & T. A. Hema. 2009. Culturable heterotrophic bacteria from the marine sponge *Dendrilla nigra*: isolation and phylogenetic diversity of actinobacteria. *Helgol Mar Res.*, 63: 239 – 247.
- Soler-Hernández, A. 2012. Biodiversidad de actinomicetos aislados de plantas depuradoras de aguas residuales. Estudio de la capacidad de biodegradación de compuestos tóxicos. Tesis de Doctorado. Universidad politécnica de Valencia, España. 243 p.
- Stach, J., L. A. Maldonado, A. C. Ward, M. Goodfellow & A. T. Bull. 2003. New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments, *Environ Microbiol.*, 5(10): 828 – 841.
- Sun, W., S. Dai, S. Jiang, G. Wang, G. Liu, H. Wu & X. Li. 2010. Culture-dependent and culture-independent diversity of Actinobacteria associated with the marine sponge *Hymeniacidon perleve* from the South China Sea. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98: 65 – 75.

- Suzumura, K., T. Yokoi, M. Funatsu, K. Nagai, K. Tanaka, H. Zhang, K. Suzuki. 2003. YM-266183 and YM-266184, novel thiopeptide antibiotics produced by *Bacillus cereus* isolated from a marine sponge II. Structure elucidation. *J. Antibiot.* 56: 129 – 134.
- Taylor, M. W., R. R. Steger & D. Wagner. 2007. Sponge associated microorganisms: evolution, ecology and biotechnological potential. *Microbiol. Mol. Biol.*, 71: 295 – 347.
- Tenover, F. C. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*, 119(6): 62 – 70.
- Thakur, N. L. & A. C. Anil. 2000. Antibacterial activity of the sponge, *Ircinia ramosa*: importance of its surface-associated bacteria. *J. Chem. Ecol.*, 26: 57 – 71.
- Thomas, T. R. A., D. P. Kavlekar & P. A. LokaBharathi. 2010. Marine drugs from sponge-microbe association – A review. *Mar. Drugs.*, 8: 1417 – 1468.
- Vijayakumar, R., C. Muthukumar, N. Thajuddin, A. Panneerselvam & R. Saravanamuthu. 2007. Studies on the diversity of actinomycetes in the Palk Strait region of Bay of Bengal, India. *Actinomycetologica*, 21: 59 – 65
- Wang, G. Y. S., M. Kuramoto, K. Yamada, K. Yazawa & D. Uemura. 1995. Homocereulide, an extremely potent cytotoxic depsipeptide from the marine bacterium *Bacillus cereus*. *Chem. Lett.*, doi:10.1246/cl.1995.791.
- Wang, G., L.M. Abrell, A. Avelar, B. M. Borgeson & P. Crews. 1998. New hirsutane based sesquiterpenes from salt water cultures of a marine sponge derived fungus and the terrestrial fungus *Coriolus consors*. *Tetrahedron*, 54: 7335 – 7342.
- Wang, G., S. Yoon & E. Lefait. 2008. Microbial communities associated with the invasive Hawaiian sponge *Mycale armata*. *ISME J.*, 8: 1 – 4.
- Ward, A. C. & N. Bora. 2006. Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Curr. Opin. Microbiol.*, 9: 279 – 286.
- Webster, N. S., K. J. Wilson, L. L. Blackall & R. T. Hill. 2001. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Appl Environ Microbiol.*, 67: 434 – 444.

- Wichels, A., S. Wurtz, H. Dopke, C. Schutt & G. Gerdt. 2006. Bacterial diversity in the breadcrumb sponge *Halichondria panicea* (Pallas). *FEMS Microbiol. Ecol.*, 56: 102 – 118.
- Wicke, C., M. Hners, V. Wray, M. Nimtz, U. Bilitewski & S. Lang. 2000. Production and structure elucidation of glycoglycerolipids from a marine sponge associated *Microbacterium* species. *J. Nat. Prod.*, 63: 621 – 626.
- Williams, P. G., R. N. Asolkar, T. Kondratyuk, J. M. Pezzuto, P. R. Jensen & W. Fenical. 2007. Saliniketals A and B, Bicyclic Polyketides from the Marine Actinomycete *Salinispora arenicola*. *J. Nat. Prod.*, 70(1): 83 – 88.
- Xin, Y., J. Huang, M. Deng. & W. Zhang. 2008. Culture-independent nested PCR method reveals high diversity of actinobacteria associated with the marine sponges *Hymeniacidon perleve* and *Sponge* sp. *Antonie van Leeuwenhoek*, 94: 533 – 542.
- Yang, C. 2013. Isolation, phylogenetic analysis and antibiotic activity screening of red sea-sponge-associated Actinobacteria. Tesis de maestría. Universidad de Thuwal, Arabia Saudita, 52p.
- Yoshida, A., Y. Seo, S. Suzuk, T. Nishino, T. Kobayashi, N. Hamada-Sato, K. Kogure & C. Imada. 2008. Actinomycetal Community Structures in Seawater and Freshwater Examined by DGGE Analysis of 16S rRNA Gene Fragments. *Mar Biotechnol.*, 10: 554 – 563.
- Zeng, Z., J. Zhao, K. Caihuan & D. Wang. 2013. Antimicrobial activities of novel cultivable bacteria isolated from marine sponge *Tedani anhelans*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 31(3): 581 – 590.
- Zhang, H., Y. K. Lee, W. Zhang & H. K. Lee. 2006. Culturable actinobacteria from the marine sponge *Hymeniacidon perleve*: isolation and phylogenetic diversity by 16S rRNA gene-RFLP analysis. *Antonie van Leeuwenhoek*, 90: 159 – 169.
- Zheng, Z., W. Zeng, Y. Huang, J. Li, H. Cai & W. Su. 2000. Detection of antitumor and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan Strait, China. *FEMS Microbiol. Lett.*, 188: 87 – 91.

12. ANEXOS

Anexo 1. Identificación taxonómica de la esponja *Aplysina clathrata*.

Phyllum: Porífera

Clase: Demospongia

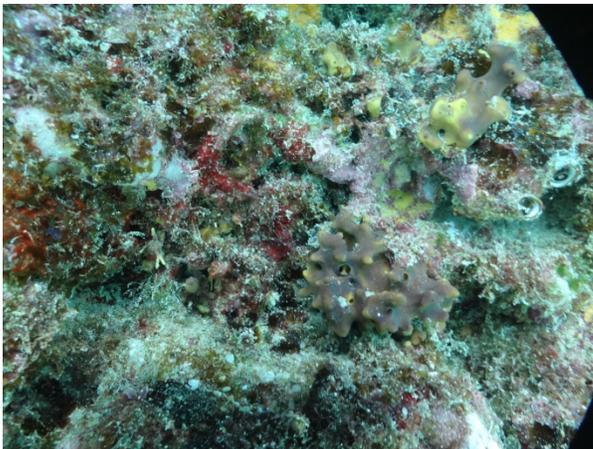
Subclase: Ceranctinomorpha

Orden: Verongida (Bergquist, 1978)

Familia: Aplysinidae (Carter, 1875)

Género: *Aplysina* (Nardo, 1834)

Aplysina clathrata sp. nov. (Cruz-Barraza, Carballo,
Rocha-Olivares, Ehrlich & Hog, 2012)



ANEXO II. Características morfológicas de las cepas aisladas de *Aplysina clathrata*.

Clave	Forma	Borde	Superficie	Color	Tinción y morfología microscópica
Ap0201	Irregular	Ligeramente ondulado	Umbonado	Café a amarillo, opaco	G + Bacilos
Ap0202	Circular	Liso	Umbonado, elevada	Café oscuro, opaco	G + Bacilos esporulados
Ap0203	Irregular	Ondulado	Convexa	Café claro	G + Bacilos
Ap0204	Filamentosa	Lobulada	Convexa	Amarillo claro	G + Cocos
Ap0205	Filamentosa	Lobulado	Elevada/Convexa	Opaca	G + Bacilos robustos
Ap0206	Circular	Liso	Elevada	Amarilla	G + Cocos
Ap0207	Circular a irregular	Liso	Elevada	Blanca a beige	G + Bacilos
Ap0208	Circular	Liso	Elevada/Umbonado	Naranja a café/ opaca	G + Cocos
Ap0209	Circular	Liso	Umbonado	Café claro a amarillo, transparente	G + Bacilos
Ap0210	Circular a irregular	Lisa	Convexa	Amarillo a café, muy claro	G + Bacilos cortos y robustos
Ap0211	Circular a irregular	Liso	Umbonado	Café verdoso	G + Bacilos
Ap0212	Circular, ligeramente irregular	Liso	Elevada/Umbonado	Crema a amarillo translucido	G + Bacilos esporulados
Ap0213	Circular	Liso	Elevada/Convexa	Café verdoso	G + Cocos
Ap0214	Circular a irregular	Liso	Umbonado/Convexa	Café oscuro al centro con bordes más claros	G + Bacilos esporulados
Ap0215	Rizoide	Lobulado	Umbilicada	Café con puntos pequeños	G+ Cocos
Ap0216	Irregular	Ondulado	Acuminada	Café	G + Bacilos
Ap0217	Irregular	Ondulada	Convexa a plana	Beige claro	G + Bacilos
Ap0218	Irregular	Ondulado	Convexa	Naranja claro	G + Cocos

Ap0219	Irregular	Lobulada	Elevada	Beige con puntos de color más oscuro	G + Bacilos largos
Ap0220	Circular a ligeramente irregular	Ligeramente ondulada	Convexa	Café a verde	G + Bacilos esporulados
Ap0221	Circular	Liso	Convexo	Beige a amarillo	G + Bacilos esporulados
Ap0222	Irregular	Ondulado	Elevada	Café oscuro a verde	G + Bacilos cortos y pequeños
Ap0501	Irregular	Filamentoso	Plano	Amarillo claro	G +Bacilos
Ap0502	Circular	Liso	Plano	Blanco	G +Bacilos
Ap0503	Circular	Entero	Plano	Hialino	G +Bacilos
Ap0504	Irregular	Irregular	Viscoso	Hialino	G +Bacilos
Ap0505	Irregular	Ondulado	Umbilicada	Naranja	G +Bacilos
Ap0506	Irregular	Lobulado	Plano	Blanco y ligeramente transparente	G +Bacilos
Ap0507	Circular	Entero	Plano	Blanco	G +Bacilos
Ap0508	Irregular	Irregular	Viscoso	Hialino	G +Bacilos
Ap0509	Circular	Entero	Plano	Hialino	G + Cocos
Ap0510	Irregular	Ondulado	Pulvinado	Blanco	G +Bacilos
Ap0511	Circular	Liso	Viscoso	Hialino	G +Bacilos
Ap0512	Circular	Entero	Plano	Blanco	G +Bacilos
Ap0513	Circular	Irregular	Viscoso	Hialino	G +Bacilos
Ap0514	Circular	Irregular	Viscoso	Hialino	G +Bacilos
Ap0515	Circular	Entero	Plano	Amarillo	G +Bacilos
Ap0516	Irregular	Lobulada	Elevada	Blanco	G + Bacilos esporulados
Ap0517	Irregular	Irregular	Convexo	Café oscuro a verde	G + Bacilos
Ap0518	Irregular	Liso	Elevada	Amarillo claro	G + Bacilos cortos y robustos
Ap0519	Irregular	Liso	Elevada	Blanco	G+ Cocos
Ap0520	Irregular	Liso	Plano	Hialino	G + Bacilos
Ap0521	Irregular	espiral	Plano	Blanco	G + Bacilos
Ap0522	Irregular	Ondulado	Ligeramente elevada	Café	G + Cocos
Ap0523	Punteada	Liso	Umbonado	Café verdoso	G + Bacilos
Ap0524	Circular a ligeramente irregular	Liso	Elevada/Umbonado	Crema a amarillo translucido	G + Bacilos esporulados
Ap0525	Circular	Liso	Convexo	Hialino	G +Bacilos

Ap0526	Irregular	Ondulado	Elevada	Amarillo	G +Bacilos
Ap0527	Circular	Liso	Umbonado, elevada	Café oscuro, opaco	G + Bacilos esporulados
Ap0528	Circular a irregular	Liso	Elevada	Blanca a beige	G + Bacilos
Ap0529					
Ap0530	Irregular	Irregular	Elevada	Blanco	G + Bacilos
Ap0531	Irregular	Ligeramente acerrada	Plana	Amarillo	G + Bacilos
Ap0532	Irregular	Irregular	Ligeramente elevada	Amarillo	G + Bacilos
Ap0533	Circular	Lisa	Elevada	Blanco	G + Bacilos
Ap0534	Irregular	Lisa	Convexa	Blanca a beige	G + Bacilos
Ap0535	Irregular	Irregular	Acuminada	Naranja	G + Bacilos
Ap0536	Irregular	Ondulado	Acuminada	Blanco	G + Bacilos esporulados muy gorditos
Ap0537	Circular	Liso	Umbonado, elevada	Café oscuro, opaco	G + Bacilos esporulados
Ap0538	Irregular	Irregular	Convexo	Café oscuro a verde	G + Bacilos
Ap0539	Circular	Liso	Convexo	Hialino	G +Bacilos
Ap0540	Irregular	Ondulado	Elevada	Amarillo	G +Bacilos
Ap0541	Circular	Liso	Umbonado, elevada	Café oscuro, opaco	G + Bacilos esporulados
Ap0542	Irregular	Ligeramente ondulado	Umbonado	Café a amarillo, opaco	G +Bacilos
Ap0543	Circular a irregular	Liso	Elevada	Blanca a beige	G + Bacilos
Ap0544	Circular	Liso	Umbonado, elevada	Café oscuro, opaco	G + Bacilos esporulados
Ap0901	Circular	Entero	Plano	Amarillo	G +Bacilos
Ap0902	Circular	Liso	Convexo	Hialino	G +Bacilos
Ap0903	Irregular	Ondulado	Elevada	Amarillo	G +Bacilos
Ap0904	Irregular	Ondulado	Acuminada	Naranja	G +Bacilos
Ap0905	Irregular	Irregular	Viscoso	Hialino	G +Bacilos
Ap0906	Irregular	Ondulado	Umbilicada	Naranja	G +Bacilos
Ap0907	Irregular	Lobulado	Plano	Blanco y ligeramente transparente	G +Bacilos
Ap0908	Circular	Entero	Plano	Blanco	G +Bacilos

Ap0909	Irregular	Irregular	Viscoso	Hialino	G +Bacilos
Ap0910	Circular	Entero	Plano	Hialino	G + Cocos
Ap0911	Irregular	Ondulado	Pulvinado	Blanco	G +Bacilos
Ap0912	Circular	Liso	Umbonado, elevada	Café oscuro, opaco	G + Bacilos esporulados
Ap0913	Circular	Liso	Umbilicada	Blanco	G +Bacilos muy cortos
Ap0914	Circular	Liso	Elevada	Amarilla	G + Cocos
Ap0915	Circular a irregular	Liso	Elevada	Blanca a beige	G + Bacilos
Ap0916	Circular	Liso	Elevada/Umbonado	Naranja a café/ opaca	G + Cocos
Ap0917	Circular	Liso	Umbonado, elevada	Café oscuro, opaco	G + Bacilos esporulados

ANEXO III. Secuencias de las bacterias aisladas de *Aplysina clathrata*.

Secuencia: Ap0201

Gen: 16S

Especie más cercana: *Bacillus sp.*

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Febrero, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 800

AGCGGAGAAATGGGAGCTTGCTCCCATTTCTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG
GGCAACCTGCCCTACAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGGTAAT
ACATAGCATCGCATGATGCAACGTTGAAAGTTGGCCTTTGGCTAACACTGTAGGATGGG
CCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCCACGATGCGTAGC
CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGT
GAGTGACGAAGGCCTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTC
GAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCG
CGCAGGCGGTCTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGCCATT
GGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTGA
CGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC
GTAACGATGAGTGCTAGTGTTGGGGGGTTCCACCCTCAGTGCTG

Secuencia: Ap0202

Gen: 16S

Especie más cercana: *Bacillus cohnii*.

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Febrero, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 580

GCCCACTTGGGGACTGAGATACGGGCCATACTCCTACGGGATGCAGCAGTGGGGAA
ATATTGCACAATGGGCGAAAATCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGATGACAGCCTT
CGGGTTGTAAACCTCTTTCTTTGGACGAAGCGTGCCTGAATATCTGGTGTAACTTGACC
GGCCTAACCAGAACCCACGGCTAACTAATTGCCAGCGTGCGAGGTAATACCTGAGTTAT
TGGGGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCTCGCAGGTGGTTTCTTGGGGCTTATG
TCTAAGCCTGCTGTTCAACCGGGGAGGGTTGTTGAAAGCTGGGGAAATTGAATTTCCAG

GAGGAGAGTGGAAATCCGCGTATATCGGGGAGAACCCTAGAGATGAAGGGGGTTCTCT
GGGGCTTTCTTGACTCTCTGGACTGAAACTGTGGGGAACGAACAAAATTAATACACCG
AACATCATTACATACCCTGGTGGTCCCTAGGGGTGGGGTGATTCTCGGTGTTCCGGGG
GGTTTCCGCCCTTTTTGCTGCCCCCGGGGAAATCCGCGCCGCCTGGGA

Secuencia: Ap0203

Gen: 16S

Especie más cercana: *Kocuria rhizophila*

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Febrero, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 580

GGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACCCCGCGTGAGGGATGAC
GGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCACGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACGTGCA
GAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGT
TGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGGTCTGCTGTGAAAG
CCCGGGGCTTAACCCCGGGTGTGCAGTGGGTACGGGCAGACTTGAGTGCAGTAGGGG
AGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGG
CGAAGGCAGGTCTCTGGGCTGTTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAAC
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGAACAT
TCCACGTTTTCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGAGTTACCGAA

Secuencia: Ap0204

Gen: 16S

Especie más cercana: *Halobacillus kuroshimensis*

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Febrero, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 800

GCGCGGGAAGCGAGTGGATCCCTTCGGGGTGAAGCTCGTGGAACGAGCGGCGGACGG
GTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGATCGGAATAACCCCGGGAAACCGGGGC
TAATGCCGGGTAATACTTTTCTTCGCATGAAGATAAGTTGAAAGATGGCTTCTCGCTATC
ACTTACAGATGGGCCC GCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGC
AACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA

GCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGAAGAA
CAAGTACCGTGCGAATAGAGCGGTACCTTGACGGTACCTGACGAGGAAGCCCCGGCTA
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
GCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAAGCCCACGGCTCAACC
GTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTTGAGGACAGAAGAGGAGAGTGGGAATTCC
CACGTGTAGCGGGTAAAATGCGTAGATATGTGGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGAC
TCTCTGGTCTGTTTCTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATA
CCCTGGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGTGTTAGG

Secuencia: Ap0205

Gen: 16S

Especie más cercana: *Kocuria rhizophila*

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Febrero, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 800

GGTGCTTGCACTGGGTGGATGAGTGCGAACGGGTGAGTAATACGTGAGTAACCTGCC
CTTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACTGGATATGACATGTCACCGC
ATGGTGGTGTGTGGAAAGGGTTTTACTGGTTTTGGATGGGCTCACGGCCTATCAGCTTG
TTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACC
GGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT
ATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCG
GGTTGTAAACCTCTTTCAGCACGAAGAAGCGAAAAGTGACGGTACGTGCAGAAGAAGC
GCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGA
ATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTTGTCGCGTCTGCTGTGAAAGCCCGGGG
CTTAACCCCGGGTGTGCAGTGGGTACGGGCAGACTTGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGA
ATTCCTGGTGTAGCGGTAAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCA
GGTCTCTGGGCTGTTACTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGAACATTCCACGTT
TTCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCGTGGGGGGGGAAAC

Secuencia: Ap0206

Gen: 16S

Especie más cercana: *Kocuria rhizophila*

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Febrero, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 580

CCGGGCTGGGAGGATGACGGGCCCCTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCG
TGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCACGGAAGAAGCGAAAGTGAC
GGTACGTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
GCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCCGTTTTGTCGCGTCT
GCTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTGTGCAGTGGGTACGGGCAGACTTGAGTG
CAGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAA
CACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCTGTTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGG
GGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGT
GGGGAACATTCCACGTTTTCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCGGGGGG

Secuencia: Ap0207

Gen: 16S

Especie más cercana: Uncultured bacterium clone

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Febrero, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 580

TGCAGTCGAGCGGACTGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTCAGCGGCGGACGGGTGAGT
AACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATAC
CGGATAGTTCTTTTCCTCGCATGAGGAAGAGTGAAAGGTGGCTTTTAGCTACCACTTAC
AGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGAT
GCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAAC
GCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGT
GCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTA
AAGCGCGCGCAGGCGGTCTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAG
GGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTACAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCACGTGTAGC
GGTGAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTA
ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTTCCGCC

Secuencia: Ap0208

Gen: 16S

Especie más cercana: *Micrococcus luteus*

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Febrero, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 580

ACACGGTGGTCACACTCCTGCGGGAGGCAACTCTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCA
AGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTC
AGTAGGGAAGAAGCAGAAAGTGACGGTACCTGCGGAATAAGCACCGGCTAACTACGTG
CCAGCAGCCGCGGTAATACCTAGGATGTTAGCGATATACGGAATTATTGGCCGAAAAGA
TCTTTAAGCCCATTATTTCCCGTATAACGCTCACACCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGG
CACGTATTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTTCTTCTTCCCTACTGAA
AGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACACGGCGTCTCTGCATCATGCTTGCA
CCCATTGTGCAATATTCCCCTACTGCTGCCTCCCGAATGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTC
CCAGTGTGCGGTCTACCTCTCAGGACGGTTACCCGTCTTCCCCTTGGTGACTCATT
CCTCACTGCCAGCTGAGGGGCCGCGAATATGTTTTATTGGGTTTGT

Secuencia: Ap0501

Gen: 16S

Especie más cercana: *Bacillus infantis*

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Mayo, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 800

CGAGCGGACGGATGGGAGCTTGCTCCCTGAAGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACAC
GTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATA
ATGCACAACCTCTCATGAGGCTATGCTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGG
GCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAG
CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGT
GAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTCAGGGAAGAACAAGTGCCGGAG
TAACTGCCGGCACCTTGACGGTACCTGACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGC
GCAGGCGGTCTCTTAAGTCTGATGTGAAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATT
GGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATCCACGTGTAGCGGTGAA

ATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAAGCGACTTTCTGGTCTGTA ACTGAC
GCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
TAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTG

Secuencia: Ap0502

Gen: 16S

Especie más cercana: Uncultured bacterium clone

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Mayo, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 580

TCTCAGGCGAATACGGAACGCAGGATTCTCCAGGACGGTTCTTTTTACCCTGTCCCTTCT
GGGGATACTTGGTCAAACGTTGCCGGTGGACCCGGAGTCACTGGGTGTCAGCTCCAAA
CGCCCTCATAATCCTCAACCCCTTCTGGGGAGGACGGACCGAAATTGACGGACCCTCCA
AAAAAGCCACCGGTA ACTTACTTGCAAGCACCGGCGAAATACCTTAGGGCGCCCGCGTT
ATCCGGAATTTTTGAGCGTTTAAAGCTAATAGGCGGGTTTTTCACGCCTCCCGTGAAATTC
CTTAGCTTTAATCTGAAGCCCCACGGGTTACCGGGGAACGCTCTTGCAATACGGGGGAA
TTTGATTCTGAGGTGGAGATGGAATTTCCCATATCACGAGGAACACCCATGGCGAAA
GCAGGTCTCTGGGCTGTCACTGACACTGAAGAGAGAAA ACTGGGGAGCCAAGAGATTAT
ATACCCTGGTACTCCACTCCATAAACCTGGGACTCCACGTGGTGAGGATTTTCTTCTAG
TTCTTCCGTGCCTTCAACACTTTATCCGCGCCCCCGTGGGGAGTAAG

Secuencia: Ap0503

Gen: 16S

Especie más cercana: *Bacillus algicola*

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Mayo, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 800

TTTGTCTGCGTCCGACGGGTGAGTAACACATGTGCAACCTGCCCTGCAGACTGGGATAA
CTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGGTAATACGTAGCATCGCATGATGCAACGTTGAA
AGTTGGCCTTTGGCTAACACTGTAGGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTAAG
GTAACGGCTTACCAAGGCCACGATGCGTAGCCGACCTGAAAGGGTGATCGGCCACCCT
GGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAATAGGGAATCTTCCGCAAT
GGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGACTAAGGCCTTCGGGTCGTAAAG
CTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTA

ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGC
GTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTCTTAAGTCTGATGTGAA
AGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGCCATTGGAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAG
GAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTG
GCGAAGCGGCTCTCTGGTCTGTACTGACGCTGATGCGCTGACAGCGTGAGGCAGCGAC
AGATAGATACCTGGTAGTCCACGCAGTAAACGATGACTGCTAGTGTGGGGGTTCTACTC
AGTGCTGAGTAACACAGTAGCACCGCTGGAGAACAGGGAAA

Secuencia: Ap0504

Gen: 16S

Especie más cercana: *Rhodococcus* sp.

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Mayo, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 580

GACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGC
GACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCGCCGACGAAG
CGTAAGTGACGGTAGGCGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGT
TTGTGCGTCGTCTGTGAAAACCTGCTAGCTCAACTACGGGCGTGCAGGCGATACGGGC
AGACTCGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAT
ATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGA
GCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGT
GGGCGCTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCG
CC

Secuencia: Ap0505

Gen: 16S

Especie más cercana: *Rhodococcus* sp.

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Mayo, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 580

TTGGGCTAGTCGCACGTGAGAGTGTGCCCGGCCGGGGGTGCACGGAGACACGGCCCA
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAG

CGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCGCCGACGAA
GCGTAAGTGACGGTAGGCGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCG
GTTTGTGCGGTCGTCTGTGAAAACCTCGTAGCTCAACTACGGGCGTGCAGGCGATACGG
GCAGACTCGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAG
ATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGG
AGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGG
TGGGCGCTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGC
GC

Secuencia: Ap0506

Gen: 16S

Especie más cercana: *Salinispora arenicola*

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Mayo, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 580

CTGGCGAGTACGGAGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATCTTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCG
TGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGTTTGTGAC
GGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGTAG
GGCGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGGCTTGTGCGGT
CGACTGTGAAAACCCGTGGCTCAACTGCGGGCTTGCAGGCGATACGGGCAGGCTAGAG
TTCTGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGA
ACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGT
GGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGG
TGTGGGGGGCCTCTCCGGTTCTCTGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGG
GA

Secuencia: Ap0507

Gen: 16S

Especie más cercana: *Rhodococcus* sp.

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Mayo, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 800

AGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGA
TCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCTCT
TGCCGCATGGTGGGGGGTGGAAAGGTTTACTGGTGCAGGATGGGCCCGCGGCCTATCA
GCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGT
GACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
GAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCC
TTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCGCCGACGAAGCGTAAGTGACGGTAGGCGCAGAAG
AAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGTC
CGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGGTCGTCTGTGAAACTCG
TAGCTCAACTACGGGCGTGACGGCGATACGGGCAGACTCGAGTACTGCAGGGGAGACT
GGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAG
GCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGAT
TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTTCTTCCAC
GGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGA

Secuencia: Ap0508

Gen: 16S

Especie más cercana: *Rhodococcus* sp.

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Mayo, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 580

CGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
GAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCGCCGACGAAGCGTAAGTGAC
GGTACGGGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
GTGCAAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGGTCT
TCTGTGAAAACCTCGGGGCTTAACTCCGGGCGTGACGGGGATACGGGCAGACTTGAGTG
CTGGAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAA
CACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGTTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCCTG
GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGT
GTGGGGGTCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGG
G

Secuencia: Ap0509

Gen: 16S

Especie más cercana: *Halobacillus* sp..

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Mayo, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 800

GGGGTGAACCTCGTGGAGCTAGCGGCGGACTGGTGAGTATCACTTGGGCAACCTGCCT
GCTCCATCGGAATAACCCCGGGAAACCGGGGCTAATGCCGGGTAATACTTTTCTTCTCA
TGAGTATCTTCTGAAAGATGGCTTCTCGCTATCCCTTACAGATGGGCCCGCGGCGCAGG
TAATGGTTGGCGAGGGAACGGCTCCCCAAGGCACCTATGCGGGTCCCTACCTGACAGGG
GGACCGGCCACCCTGGGACTGACACACGGCCCGGACTCCTACGGGAGGCTCCACTAT
GGAATCTTCCCAATGGACCAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTTGAAGAATGAAGGTC
TTCGGATCTTAGAAATATGTTGTACCGGAAGAACAAGTACCGTCCTTATAGGGCGCTACC
TTGACGGTCCCTGACAAGTAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCACCTACCGGGGTAATACT
TACGGGGAATGCTTTGTCCGAAATTATTGGGCGTAAATCCCTCACTCGCAGTTCCTTAAC
TCTGATGTGAACGCCACGGTTCATCCGAGCAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAG
TGCAGATCAGGATAGTGCAGTTCACGTGTAGAGATGAAATGCAAAAACATGTGGAGGA
GCACCTCTGTGGAATGTGACTCTCTGTTCTGTTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGT
GTATCCCACGGGATTACATACCCTGAAAGACCACTCCTTAGACTATGAGTGCTACGTGCT
CTGAGTGTTCCACTCCATTACTGCTGCACTCAG

Secuencia: Ap0510

Gen: 16S

Especie más cercana: *Bacillus licheniformis*

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Mayo, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 800

ATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAG
TAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATAC
CGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATTATAAAAGGTGGCTTCTGCTTACCCTTTCC
GAAGGGCCCCCGGCCATTACTTATTGGGGAAGGAACCGGTCCACCAGGGCACCAAT
CCTAACCCAACTGGAAAGGGGTCCGGCACCCCTGGGACCGGAACCCCGGCCAAATCC
TTCCGGAAGGCACCATTGGGAATCCTCCCCATGGAACAAAGTTTGAACGAACCACCCC
CCCGGGATTGATAAAGGTTTTCGAATCTAAACTTCTTTGGTTAGGAAAAACCAATTCCG
GTTCAATTAGGGCGGACCTTGGCCGTTCTTACCCAAAAGCCCCGCTTACTACCTTGCC

AGCACCGGGGAATACTAAGTGGAAACCTTTGTCGGGATTATTGGGCTAAAGCCCGCG
CAGGCGTTTTCTAAGTCTGATGGGAAAGCCCCGGCTTAACGGGGGGAGGGTCATTGGA
AACTGGGGACTTGAGTGCAAGAAGGAGGGAATGGGATTCCACGGGTAGCGGTGAAATG
CGTAGAGATGTGAAGGAACACCAGTGCGAGGCGACTCTTCTGTCTGTAAGTACTGACGCTGA
GGCGCGAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCCGCCGTAAACGA
TTGATGCTTCTGTAAGGTTGCTTAATGCTTGCAGCAA

Secuencia: Ap0511

Gen: 16S

Especie más cercana: *Halobacillus kuroshimensis*

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Mayo, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 580

GAAGCGAGTGGATCCCTTCGGGGTGAAGCTCGTGGAACGAGCGGCGGACGGGTGAGT
AACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGATCGGAATAACCCCGGGAAACCGGGGCTAATGC
CGGGTAATACTTTTCTTCGCATGAAGATAAGTTGAAAGATGGCTTCTCGCTATCACTTAC
AGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGAT
GCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAAC
GCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTCAGGGAAGAACAAGT
ACCGTGCGAATAGAGCGGTACCTTGACGGTACCTGACGAGGAAGCCCCGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTA
AAGCGCGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAG
GGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGGACAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAG
CGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTG
TTTCTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
CACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGGCTTCCACCC

Secuencia: Ap0512

Gen: 16S

Especie más cercana: *Ornithinimicrobium* sp.

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Mayo, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 580

TGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGG
ATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCTCTGACGAAGCCTTCGGGTGACGGTA
GGAGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGC
GAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTTGTAGGCGGTTTGTGCGCTCTGCTG
TGAAAGCCCAGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTGGGTACGGGCAGGCTAGAGTGTGGT
AGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACC
GATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCACTACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGGGA
GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGG
GTCCCATTCCACGGGGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGGAA

Secuencia: Ap0513

Gen: 16S

Especie más cercana: *Janibacter* sp.

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Mayo, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 580

CTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGG
GATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTAC
CTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGC
AGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTTGTAGGCGGTTTGTGCGCTCTGCTGT
GAAAATCCGAGGCTCAACCTCGGACTTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGTGGTA
GGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCG
ATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCACTACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCATGGGGAGC
GAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGA
CTCATTCCACGAGTTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGAG

Secuencia: Ap0514

Gen: 16S

Especie más cercana: *Rhodococcus* sp..

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Mayo, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 800

CCCTTCGGGGTACACGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCA
CTTCGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCTCTTGCCGCATGGT
GGGGGGTGGAAAGTTTACTGGTGCAGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTG
GGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCAC
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCAC
AATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTA
AACCTCTTTCAGCGCCGACGAAGCGTAAGTGACGGTAGGCGCAGAAGAAGCACCGGCC
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGTCCGGAATTACTG
GGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGGTCGTCTGTGAAAACCTCGTAGCTCAACTA
CGGGCGTGACGGCGATACGGGCAGACTCGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTG
GTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCT
GGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCT
GGTAGTCCACGCCGTAACGGTGAGCGCTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGT
GCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCAGGGGAAGTTACCGGCCA

Secuencia: Ap0515

Gen: 16S

Especie más cercana: *Rhodococcus* sp..

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Mayo, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 580

GCCGCCGAGTGAGGGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGCGAGGCAGCAGTGGGGAAT
ATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCG
GGTTGTAAACCTCTTTCAGCGCCGACGAAGCGTAAGTGACGGTAGGCGCAGAAGAAGC
ACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGTCCGGA
ATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGGTCGTCTGTGAAAACCTCGTAGC
TCAACTACGGGCGTGACGGCGATACGGGCAGACTCGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAA
TTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGG
GTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACCGG
ATCCCTGCCGGAATAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGAGAGGGACGGGGACGAATCC

Secuencia: Ap0516

Gen: 16S

Especie más cercana: Uncultured bacterium clone

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Mayo, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 580

TACTGTTGACTTCTAGTCTGCTTATTTAACTTGCCTGATGGGCCGGGACTCATCCTGCTC
ATCCCCGTGTA CTCTGACGACCTTCGGGTTTCATCCCCTTTGGCGAGTACGGAGCCTCT
TTTACGGTAATGGGTAAAGAAGCACCGGCTAACTACATGCCAGCACCCGCGGTGATACG
TATGGTGCAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGCTCGTACGCGGTTGATCGC
GTCCGAAGTGTAATCTTAAACCCTGAGCTTGAGCCCGGTTTCGCAAGCGGTTGGGTTTA
TGATGGTTTTGCGAGAATAGAAGTTTTAAGACTAGGGGGGGCTTTCAAAGTTCAGTGGC
AACCTGCAGCGTTGGGCGTATCCAGTCTTAATTGCGTGTCCGCTATTTTACGCCAGTCC
ACCCGACGGGTAGGTTTTTGGGGCATTTCGAAACCACAATATGGTGGCCCTTCCGGGGC
CTGAAAGCTCTCCTTTCCCTAGTATTTGGAGATCTGAACCACCCAGGGGGGGAGGTAAG
AGGGGAGTTTGCGGAGTGTGTTTGAATCCTGCTTCGATATCTTGTATGA

Secuencia: Ap0517

Gen: 16S

Especie más cercana: Actinobacterium

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Mayo, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 580

CCGGCCACACTGGGACTGACACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTT
CGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCTCTGACGAAGCCTTCGGGTGACGGTAGGAGCAGAAGA
AGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCC
GGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTTGTAGGCGGTTTGTGCGGTCTGCTGTGAAAGCCCGG
GGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTGGGTACGGGCAGGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGACT
GGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAG
GCAGGTCTCTGGGCCACTACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGAT
TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGTCCCATTCCAC
GGGGTCCCTGCCGAGCTAATGCCTTAAGCGCCCCGCCTAGGGGACTACGGAGACCC

Secuencia: Ap0518

Gen: 16S

Especie más cercana: *Nocardia* sp.

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Mayo, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 580

GCCGCCTGGGAGGGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
TGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGG
GTTGTAAACCTCTTTTCTGACTCCGACGAAGCGCAAGTGACGGTAGGAGTAGAAGAAGCAC
CGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAAT
TACTGGGCGTAAAGAGCTTGTAGGCGTTTTGTGCGTCTGTGAAAACACAGCTC
AACTGTGAGCCTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATT
CCTGGTGTAGCGGTGGAATGCTCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCAAAGGCGGCT
CTCTGGGCAGGTTTTGACCCTTAGCGCAAATCCCGGTGGTTGCACCCGAATAATACT
GGGCGGGCCTCAGCCCAATCGTGGCCGGCCACCTTCTAAGGCGGTCTACCGGTCTCC
GCCTTGATAGGCCTTTACCCACCACCACGCTGATGGGCCAGGAGACAATCTGATAGG

Secuencia: Ap0519

Gen: 16S

Especie más cercana: *Janibacter* sp.

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Mayo, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 580

GCAGACTGAGGACTGAGACACGGCCCACACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
TGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGG
GTTGTAAACCTCTTTTCTGACTCCGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCAC
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAAT
TATTGGGCGTAAAGGGCTTGTAGGCGTTTTGTGCGTCTGCTGTGAAAATCCGAGGCTC
AACCTCGGACTTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGTGGTAGGGGAGACTGGAATT
CCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCAAAGGCAGGT
CTCTGGGCCACTACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATA
CCCTGGTAGTCCATGCCCTAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGACGCATTCCACCAGTTC
CCTGCCTGGGAGTAACATATATATTCGCCACACCTTGGATGGTGCCGGGGAAAGT

Secuencia: Ap0520

Gen: 16S

Especie más cercana: Uncultured bacterium clone

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Mayo, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 580

ACTACAGTGAAGCTTCTGGGGAGATCTTCTGCAGTGTTTGAAAGCCTGACCGAGGAACA
CCGCGTGAGCGATGAAGGCCTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTA
CCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGTGTAAA
GCGCGCGCAGGCGGTCCCTTATGTCTGAGGTGAAAGCCCACGGCTTACCCGTGGAGGT
CCGTTGAAAAGTGGGGAAGTTCCCTCCCGATTTCAGAACGGTACATGTTCTTCCCTAACAA
AGAGCTTTACGACCCGAAGGCCTTCATCGCTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGGCTTTCT
CCCATTGCCGAACATCCCTAGTGCTGCCTCCCGTATGAGTCTGGGCGGTGTCTCACTCC
CTATGTGGCCAATCACCTCTCAGGTCCGGTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCCTTAC
CTCACCAAGCTGATAGGGCCGCGAGAATTTTTTTTTGTCCCGTTTTTT

Secuencia: Ap0901

Gen: 16S

Especie más cercana: *Kocuria rosea*.

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Septiembre, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 580

GACTACGGAGCCGGCGCTGAGAGGGTGACCGGCCACACGTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGC
AGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAG
AAGCCACAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGG
CGGTTTGTGCGCTCTGCTGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGGTCTGCAGTGGGTAC
GGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGC
AGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCTGTTACTGACGCTGA
GGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAAC
GTTGGGCACTAGGTGTGGGGGACATTCCACGTTCTCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAA
G

Secuencia: Ap0902

Gen: 16S

Especie más cercana: *Arthrobacter tumbae*

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Septiembre, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 580

AGGGTGGACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
GTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGA
AGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCA
GAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGT
TATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTTCGCGTCTGCCGTGAAAG
TCCGGGGCTTAACCCCGGATCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTTGAGTGATGTAGGGGA
GACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGC
GAAGGCAGGTCTCTGGGCATTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACA
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGGACATT
CCACGTTTTCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGGAAGTACGG

Secuencia: Ap0903

Gen: 16S

Especie más cercana: Uncultured bacterium clone

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Septiembre, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 580

TGGGAGTACGTGTCCCCGCCTGGGGAGTACGGAGCCCTACACTCCTACGGGATGCAA
CACTGGGGAATATTGCCCAATGGGCGGAGGCTGATGCATCAACTCCATGTGAGGGATG
ACGGCCTTCCCGTTGTAAACCACTTTGCCTGTGACGAAGCCTGAGTGACGGTAATGGGT
AAAGAAGCACCGGCTAACTACATGCCAGCAGCCGCGGTGATACGTATGGTTCGAGCGT
TGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGGGCTCGTACGTGGTTGATCGCGTCCGAATTGTAAT
CTTGGGGCTTAACCCTGAGCGTGCTTTTCGATACGGGTTGACTTGAGGAAGGTAGGGGA
GAATGGAATTCCTGGTGCAGGGGGGAAATGCGCAAATATCAGGAGGAACACCAATGGC
CAAGGCGGTTCTCTGGGCCTTTCTGACGCTGAGGACCGAAAACGTGGGGAGCGAACA
GGCTTAAATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGGTGGGTACTAGGTGTGGGGTGCATT
CCACGGGTTCCGGGCCGTAGCTAACGCTTTAAGTACCCCGCCTGGGGGAGTACGG

Secuencia: Ap0904

Gen: 16S

Especie más cercana: *Rhodococcus* sp.

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Septiembre, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 580

ACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGA
GGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCGCCGACGAAGCGTAAGTGACGG
TAGGCGCAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGT
GCAAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTTCGCGTCGT
CTGTGAAAACCTCGTAGCTCAACTACGGGCGTGCAGGGCGATACGGGCAGACTCGAGTAC
TGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAAC
ACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGG
GTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTG
TGGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGG
AA

Secuencia: Ap0905

Gen: 16S

Especie más cercana: *Rhodococcus* sp.

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Septiembre, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 580

GGGTGACCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACG
GCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCGCCGACGAAGCAGTAAGTGACGGTAGGCGCA
GAAAAGCACCGGCCAACTACCTGCCAGCAGCCGCGGTAATACTTACGGTGCAAGCGT
TGTCCGGAATTTCTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTACGTCGCCTGTGAAAA
CTCGTAGCTCAACTACGGACGTGCACGCGATACCGGCAGACTCGAGTACTGCACGGGA
GAATGGAATTCCTGGTGAAGCGATGAAATGCCAGATATCACGAGGAACTCCGGTGGC
GAATGCAGGTCTCTGGGCGTAACTGACGCTCAGGAGCGAAACCTGGGTAGCAAACAG
ATTCATACCCTGGTAGTCCGCGCCGAAAACGGGGGGCGCTAGGTGTGGGTTTCCTTCC
GCTAGATCCGTGCCGTATCTAACGTATTAACGCCCGCTGGGAATACGGCCGCCGGTGA

Secuencia: Ap0906

Gen: 16S

Especie más cercana: *Rhodococcus* sp.

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Septiembre, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 580

GGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT
ATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCG
GTTGTAAACCTCTTTCAGCGCCGACGAAGCGTAAGTGACGGTAGGCGCAGAAGAAGC
ACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGTCCGGA
ATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGGTCATCTGTGAAAACCTCGTAGC
TCAACTACGGGGGTGCAGGCGATACGGGCAGACTCTAGTACTGCACGGGAGACTGTAA
TCCTGGTGGGCGTTGAAAAGGTTAAAACCCGAAGGCCCGCCTTCCGTCAAAGGGGGTCC
TTGCGCCAGGATTTGACCCTTAGAGCAAATTCCCGATTGCTGCCTCGGGTAGGATCCC
GGGCCGGGCCTCACCCCAAATGGGGCCGGCCAGGTGCGGGTGTGCGTTACCGGTATC
CGCGTTGTAACGCCAGTACTACGCGACCAGCCTGAGGAGCACGGGAAGGGGTGGGGG
G

Secuencia: Ap0907

Gen: 16S

Especie más cercana: *Rhodococcus* sp.

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Septiembre, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 580

GCCGCGCTGGGAGGGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGG
GTTGTAAACCTCTTTCAGCGCCGACGAAGCGTAAGTGACGGTAGGCGCAGAAGAAGCA
CCGGCCAACACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGTCCGGAA
TTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGGTCGTCTGTGAAAACCTCGTAGCT
CAACTACGGGCGTGCAGGCGATACGGGCAGACTCGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAAT
TCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGG
TCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTTTCCTTCCACGGGA
TCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGGAACCTGATTTAG

Secuencia: Ap0908

Gen: 16S

Especie más cercana: *Micrococcus* sp.

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Septiembre, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 580

TGAGTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATG
GGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAAC
CTCTTTCAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACT
ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCG
TAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGCCGCGTCTGTCGTGAAAGTCCGGGGCTTAACCCCGG
AGCTGCGGCGGGTACGGGCAGACCATAGTGCGCAAGGGCAGACTGTTTTTCTTCGTGC
CTAGGGAAAGAGGTTTAATACCCGGAGGAAGTCATCCCTCAAGCGGCGGCCCTTCATCA
GGCTTGCACCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTG
TCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTACCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGTGCGCCTTGGT
GAGCCATTACCTCACCAACCAGCTGAAGGGCCGCGAAATCTCCTTTTTTCCTTCGA

Secuencia: Ap1101

Gen: 16S

Especie más cercana: *Bacillus algicola*.

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Noviembre, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 800

AGGTGGCCGACTGGTGAGTTACGGTGGGGCAACCTGCCCTACAGACTGGGATAAGTCC
GGGAAACCGGAGCTAATACCGGGTAATACGGAGCATCGCATGATGCAACGTTGAAAGTT
GGCCTTTGGCTAACACTGTAGGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAA
CGGCTTACCAAGGCCACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGA
CTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGAC
GAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGACGAAGGCCTTCGGGTCGTAAAGCTCT
GTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCA
GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTG
TCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCCGGTCTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
CACGGCTCAACCGTGGAGGGCCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGA
GTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGA

AGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGGGGGTTCCA
CCCTCAGTGCTGAAGTTAACACATTAAGCACCCCGTGGGGGGA

Secuencia: Ap1102

Gen: 16S

Especie más cercana: *Bacillus algicola*.

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Noviembre, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 800

AAGTCAAGGGACCATTGTCAGTGCGCTCGCACGCACAATAAAACTGAACAAACCAG
CCATCAGAGCAGCGATATCACCCATTGCTGCCAGCCGCGCGGGTCCAAGTCCTTTTAGG
AAGTCCAGGAATCCACTCAAAGTTGCCGCCCCGCCGGGGAGTACGGAACACTGTAGGA
TGGGCCCGCGGCGCACTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCCACGATGGG
TAACCGACGTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTA
CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCG
CGTGAGTGACGAAGGCCTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCG
TTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCC
AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCG
CGCGCAGGCGGTCTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGCCA
TTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGT
GACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
CCGTAAACGATGAGTGCTAGTGTTGGGGGGTTTACCCTCA

Secuencia: Ap1103

Gen: 16S

Especie más cercana: *Brevibacterium iodinum*.

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Noviembre, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 800

GGGGACCAGGCTGGCGAATCGGCCTGAGTGCCGAACGGGTGAGTCCATGTGGCTCTCT
GCCCCTGATTTTCGGGATAAGCCTGGGAAGCTGGGTCTAATACCGGATACGACCAATCCT
CGCATGAGGATTGGTGGAAAGTTTTTCGATCGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTT

GTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGAC
CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA
TATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCGACGCAGCGTGCGGGATGACGGCCTTC
GGGTTGTAAACCGCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAG
TACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTACGAGCGTTGTCCGG
AATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTGGTCACGTCTGCTGTGGAAACGCAACG
CTTAACGTTGCGCGTGACAGTGGGTACGGGCTGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGTCTGGA
ATTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCG
GGACTCTGGGCTGTAAGTACACTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGGACATTCCACGTT
CTCCGCGCCGTAGCTAACGTCATTAAGTCCCTGCTGTGGGAAAA

Secuencia: Ap1104

Gen: 16S

Especie más cercana: Uncultured *Bacillus* sp.

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Noviembre, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 800

GGAGCTTGCTCCCATTTCTCTCGGCGGATGGGTGAGTAACCCATGGGAAACCTGCCCT
GCCCACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACGGGTAATACATAGCATCACTC
GATGCAACGTTGAAAGTTGGCCTTTGGGGAACACTGTAGGATGGGCCCGCGGCATT
AGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCCACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGG
TGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
GAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGACGAAGGCC
TTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTAC
CTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTCTT
AAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGCCATTGGAAACTGGGGGACT
TGAGTGACAGAAGAGGAGAGTGGAAATTTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTG
GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAA
GCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGC
TAGTGTGGGGGGGTTCCACCCTCAGTGCTGAAGTTTACAC

Secuencia: Ap1105

Gen: 16S

Especie más cercana: *Brevibacterium* sp.

Lugar y fecha de colecta: Punta Arena de la ventana, B. C. S., México. Noviembre, 2012.

Lugar de secuenciación: MACROGEN, Seúl, Corea.

No. de bases: 580

```
TGGTCACATGCCTACGCGGGGGCGACTCTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCT
GATGCAGCGACGCAGCGTGCGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTCAGCAG
GGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGTACCGGCTAACTACGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACGTAGGGTACGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCG
TACGTGGTTGGTCCGTCTGCTGTGGAACGCAACGCTTAACGTTGCGCGTGGAGCGGGT
TCGGGCTGACTTCAGTCGGAAGGGGAGTCCGGTACTCTTCGTCCCGGCGGAAAACGGT
TAAAACCCGGAGGCAGACAGCCGGCGAGCGGCGGCCCTTCATCAGGGTTTCCCCCAG
TGGGCAGAATTCCCGAGGGGTGCCTCCGGGAGGAGACTGGGCGGTGTCCCATGCCCA
ATGTGGCGGGCCGCGTGTGGGCGAGTTACCGCTCCCCCTTGGTAGCTATTACCCCA
CCAGCACCCCAGGGGCCGCGAGAGGGGGGTTGGTTAGATTACACGAGGCTAGGGATA
AA
```