



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIOS SOBRE LA BIODIVERSIDAD
MICROBIANA DEL TRACTO DIGESTIVO DEL
CAMARÓN BLANCO LYTOPENAEUS
VANNAMEI**

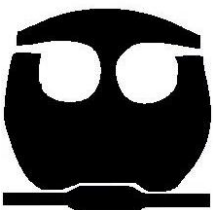
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

KARLA ERAZO GUERRERO



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE

VOCAL: **Profesor:** ALEJANDRO CAMACHO CRUZ

SECRETARIO: **Profesor:** LUIS ÁNGEL MALDONADO MANJARREZ

1er. SUPLENTE: **Profesor:** RUTH EDITH MARTIN FUENTES

2° SUPLENTE: **Profesor:** MARTHA GILES GOMEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Universidad Nacional Autónoma de México,
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Laboratorio de Biodiversidad y Bioprospección

Microbiana, Ciudad Universitaria, México, D.F.

ASESOR DEL TEMA: DR. LUIS ÁNGEL MALDONADO MANJARREZ

(Nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO (Si lo hay):

(Nombre y firma)

SUSTENTANTE: KARLA ERAZO GUERRERO

(Nombre y firma)

INDICE

Datos del jurado	2
Resumen	4
1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	
2.1 Hábitat y biología del camarón blanco	8
2.2 Rasgos biológicos de <i>Litopenaeus vannamei</i>	9
2.3 Sistema Digestivo del Camarón	9
2.4 Microbiota intestinal del camarón	10
2.5 Bacterias ácido lácticas	12
2.6 La clase <i>Actinobacteria</i>	14
2.7 Caracterización microbiana	16
2.7.1 Aspectos fenotípicos de la caracterización microbiana	17
2.7.2 Aspectos genotípicos de la caracterización microbiana	18
2.7.2.1 Reacción en cadena Polimerasa (PCR)	19
2.8 Planteamiento del Problema	22
3. OBJETIVOS	
3.1 Objetivo General	23
3.2 Objetivos Particulares	23
3.3 Hipótesis	23
4. MATERIALES Y METODOS	24
4.1 Cultivo y aislamiento de cepas	26
4.2 Utilización de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno	27
4.3 Pruebas de degradación de sustratos	29
4.4 Extracción de ADN de los aislados	30
4.5 Electroforesis Horizontal	31
4.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	32
4.7 Purificación de los productos de PCR	33
4.8 Secuenciamiento del producto de PCR	34
4.9 Comparación empleando GenBank y BLAST	34
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
6. CONCLUSIONES	46
7. PERSPECTIVAS	47
8. BIBLIOGRAFÍA	48
9. ANEXOS	56
9.1 Medios de Cultivo	56
9.2 Soluciones y Buffers de trabajo	57
9.3 Secuencias y resultados de la opción BLAST para cada uno de los aislados	
9.3.1 Secuencia KEG-AD-01 (1499 pares)	58
9.3.2. Secuencia KEG-AD-02 (1509 pares)	59
9.3.3. Secuencia KEG-AD-04 (1637 pares)	60
9.3.4 Secuencia KEG-AF-01 (1466 pares)	61
9.3.5 Secuencia KEG-AH-01 (1495 pares)	62
9.3.6 Secuencia KEG-AG-02 (1668 pares)	63
9.3.7 Secuencia KEG-AK-01 (1496 pares)	64
9.4 Tablas de Resultados de Pruebas Fenotípicas	65

RESUMEN

La microbiota intestinal juega un papel importante e influye de manera directa en la nutrición y la salud de los macro-organismos por lo que resulta necesario el conocimiento de la microbiota sobre todo si se trata de organismos de interés en la economía. En este sentido y en el caso particular del camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, se han realizado algunos estudios respecto a aspectos relacionados con la presencia de bacterias tanto en el agua, como en el tracto digestivo, ya sea en relación con la calidad del agua, el efecto de la presencia de microorganismos en el agua así como la influencia en la digestibilidad y actividad enzimática, en las rutas de colonización del tracto digestivo y efecto en el crecimiento. Sin embargo, es poco o casi nulo el conocimiento que existe respecto a comparaciones donde se empleen técnicas moleculares (no dependientes del cultivo) y técnicas tradicionales (dependientes del cultivo). En el presente trabajo, se trabajó en el aislamiento, caracterización e identificación de microorganismos de la clase *Actinobacteria* (bacterias Gram positivas con un alto contenido de Guanina y Citosina) recuperados del tracto digestivo de *Litopenaeus vannamei*. Se emplearon técnicas de aislamiento selectivo con diferentes medios de cultivo y antibióticos, los microorganismos aislados se purificaron y agruparon con base en su morfología. A un representante de cada grupo formado se le amplificó el gen 16S rRNA para establecer su posición taxonómica con las bases de datos de acceso gratuito y se les realizaron pruebas de utilización de fuentes de carbono, nitrógeno así como de degradación para caracterizar los aislados recuperados y asignarles un nivel de género o especie según fuera el caso.

Palabras clave: *Actinobacteria*, *Litopenaeus vannamei*, tracto digestivo, gen 16S rARN

1. INTRODUCCIÓN

El camarón blanco *Litopenaeus vannamei* es nativo de la costa oriental del Océano Pacífico; desde Sonora, México al Norte, hacia Centro y Sudamérica hasta Tumbes en Perú, habitando en aguas cuya temperatura es normalmente superior a los 20 °C durante todo el año. *Litopenaeus vannamei* se encuentra distribuido en hábitats marinos tropicales (FAO). El cultivo de camarón es una industria que tuvo una producción estimada en el 2008 de 3.34 millones de toneladas (GOAL, 2008) siempre en constante aumento.

El cultivo de organismos acuáticos para consumo humano es una de las actividades productoras de alimento con mayor crecimiento a nivel mundial, como lo indica la FAO (2008) en su último informe del estado actual de las pesquerías y acuicultura. En este reporte se señala que la producción se ha incrementado de un 3.9% de la producción total en peso en 1970 a un 36% en 2006. En el mismo periodo, el crecimiento de la producción acuícola fue más rápido que el de la población y el suministro acuícola per cápita pasó de los 0.7 kg en 1970 a los 7.8 kg en 2006, lo cual supone un crecimiento medio anual del 7.0%. La acuicultura mundial se ha incrementado drásticamente en los últimos 50 años y una de las principales razones por las que se expande de manera vertiginosa es debido al bajo crecimiento de la producción de las pesquerías comerciales en todo el mundo, aunado a la intensificación y mayor eficiencia productiva acuícola (Klaenhammer & Kullen, 1999).

La microbiota intestinal juega un papel importante influyendo directamente en la nutrición y la salud de los animales en general. Por esto mismo, al alterarla se afecta el estado fisiológico de los organismos incluyendo la inmunidad, el crecimiento y el desarrollo general (Al-Harbi & Uddin, 2005). El uso de probióticos preparados con microorganismos se torna de gran interés en la acuicultura, particularmente en relación a la productividad, la nutrición, el control de enfermedades, en la calidad del agua de los estanques y el impacto de los

afuentes en el ambiente (Moriarty, 1997) por lo que es necesario un profundo conocimiento de la microbiota involucrada para poder evaluar el efecto del uso de probióticos y contribuir a la preparación de estos aditivos. La diversidad microbiana es una fuente importante de productos y procesos biotecnológicos.

En el caso del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* se han estudiado diversos aspectos relacionados con la presencia de bacterias en el agua y en el tracto digestivo (Wang *et al.*, 2005) como el efecto de la presencia de microorganismos en el ambiente acuático lo que evidentemente influencía en la digestibilidad y actividad enzimática (Buford *et al.*, 2003; Moss *et al.*, 2001) así como en las rutas de colonización del tracto digestivo (Simoes *et al.*, 2002) y tiene un efecto en el crecimiento (Wang, 2007).

Una limitante en estos estudios ha sido el aislamiento e identificación de las bacterias involucradas. Durante la década pasada el acercamiento al análisis de la composición microbiana cambió considerablemente, debido sobre todo a que las técnicas clásicas como el cultivo y la identificación microscópica no son suficientes para evaluar la diversidad de bacterias en muestras ambientales (Schäfer & Muyzer, 2001). Los métodos tradicionales para caracterizar la diversidad bacteriana en diferentes ambientes únicamente han permitido recuperar entre el 0.1 y el 10% de las bacterias (Rondon *et al.*, 1999; Watts *et al.*, 1999; Torsvik & Ovreås, 2002, Torsvik *et al.*, 2002) por lo que la introducción de técnicas moleculares en microbiología han tenido un impacto directo en distintos aspectos tales como la rapidez, obtención de perfiles genéticos y estimación de la comunidad microbiana. El estudio del gen del 16S rRNA permite establecer relaciones evolutivas entre microorganismos y obtener la secuencia con la subsecuente construcción de árboles filogenéticos permite asignar microorganismos a los distintos niveles taxonómicos tales como género y/o especie (Woese, 1987; Schäfer & Muyzer, 2001). Acceso a bases de datos tales como GenBank favorecen la identificación de microorganismos “desconocidos” una vez obtenida su secuencia del gen 16S rRNA previa amplificación por **PCR**

(del inglés, **P**olymerase **C**hain **R**eaction -Reacción en Cadena de la Polimerasa-Sanz & Köchling, 2007; Cedeño, 2005).

La clase *Actinobacteria* es un grupo de bacterias filamentosas, que presentan un crecimiento en forma de red llamado *micelio*. Precisamente por la formación de este *micelio* es que, entre otras cosas, se les consideró por muchos años como el puente evolutivo entre las bacterias y los hongos. Aunque las dimensiones son mucho más reducidas que el micelio de los hongos, son en muchos sentidos comparables. La mayoría de las actinobacterias producen esporas y la forma en que éstas se generan y se agrupan puede emplearse como herramienta fenotípica para la separación de distintos subgrupos. El contenido del DNA es de 63-78% de Guanina y Citosina lo que permite definirlos como bacterias Gram positivas con un alto contenido de Guanina y Citosina. La clase *Actinobacteria* resulta de especial interés por su versatilidad en amplias y distintas actividades metabólicas (Groth & Saiz-Jimenez, 1999; Madigan & Martinko, 2006).

Hoy en día inclusive se considera que las actinobacterias están implicadas en la formación de biopelículas (Warsheid & Braams, 2000). Este amplio y diverso grupo bacteriano (conocido por muchos años como *actinomicetos*) cuenta con un extenso espectro de utilización de nutrientes que los hace capaces de emplear compuestos “complejos” tales como hidrocarburos aromáticos y alifáticos, macromoléculas como la lignina y sustancias húmicas (Ball *et al.*, 1989; Saiz-Jiménez, 1997; Groth & Saiz-Jiménez, 1999; Zanardini *et al.*, 2000). A pesar de que posiblemente las Actinobacterias muestren un papel ecológico importante en los ecosistemas donde se encuentren, su mayor impacto comercial es en la industria farmacéutica como productores de metabolitos secundarios (Bérdy, 1995; Lazzarini *et al.*, 2000), sobre todo para la síntesis de antimicrobianos y antitumorales.

2. ANTECEDENTES

2.1 Hábitat y biología del camarón blanco

Litopenaeus vannamei se encuentra distribuido en hábitats marinos tropicales (Figura 1). Los adultos viven y se reproducen en mar abierto, mientras que la postlarva migra a las costas a pasar la etapa juvenil, la etapa adolescente y pre adulta en estuarios, lagunas costeras y manglares. Los machos maduran a partir de los 20 g y las hembras a partir de los 28 g en una edad de entre 6 y 7 meses. Cuando el camarón blanco pesa entre 30 y 45 g libera entre 100 000 y 250 000 huevos de aproximadamente 0.22 mm de diámetro. La incubación ocurre aproximadamente 16 horas después del desove y la fertilización. En la primera etapa, la larva (denominada *nauplio*) nada intermitentemente y es fototáctica positiva. Los nauplios no requieren alimentación, sino que se nutren de su reserva embrionaria. Las siguientes etapas larvarias (*protozoa*, *mysis* y *postlarva temprana*, respectivamente) continúan siendo planctónicas por algún tiempo, se alimentan del fitoplancton y del zooplancton y son transportados a la costa por las corrientes mareales. Las postlarvas (PL) cambian sus hábitos planctónicos unos 5 días después de su metamorfosis a PL, se trasladan a la costa y empiezan a alimentarse de detritos bénticos, gusanos, bivalbos y crustáceos (FAO, 2006).



Figura 1. Principales países productores de *Litopenaeus vannamei* (Estadísticas Pesqueras de la FAO, 2006)

2.2 Rasgos biológicos de *Litopenaeus vannamei*

El camarón blanco cuenta con un rostro moderadamente largo con 7–10 dientes dorsales y 2–4 dientes ventrales. En los machos maduros hay un petasma simétrico y semi abierto. Los espermátóforos son complejos, consistentes de masa espermática encapsulada por la vaina. Las hembras maduras tienen el téllico abierto y cuenta con seis nauplios, tres proto-zoeas y tres etapas de mysis (Figura 2). Su coloración es normalmente blanca translúcida, pero puede cambiar dependiendo del sustrato, la alimentación y la turbidez del agua. Se ha reportado que la talla máxima es de 23 cm, con CL máxima de 9 cm. Comúnmente las hembras crecen más rápidamente y adquieren mayor talla que los machos de acuerdo con lo indicado por la FAO en 2006.



Figura 1. Progenitor Hembra

(http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus_vannamei/es)

2.3 Sistema Digestivo del Camarón

En los camarones el sistema digestivo se compone de boca, estómago, hepatopáncreas; situados en el cefalotórax; un intestino, una glándula intestinal en el abdomen y el ano situado ventralmente donde comienza el telsón (Cruz, 1996).

La digestión comienza en la cavidad cardiaca del estómago y continúa en los túbulos del hepatopáncreas. Es a nivel de ésta glándula que la digestión se hace más activa, con la participación de enzimas producidas por células especializadas (Molina *et al.*, 2002).

2.4 Microbiota intestinal del camarón

En el ambiente marino las bacterias Gram negativas son predominantes pero en contra parte las Gram positivas son usualmente las que están asociadas a la microbiota en camarones silvestres y de cultivo (Morales, 2000; García, 2003). La gran mayoría de los microbios presentes en el ambiente marino (bacterias, virus, hongos o parásitos) son inocuos o son controlados exitosamente por los mecanismos internos de defensa de los organismos en cultivo (Morales, 2000). Las etapas tempranas del ciclo de vida de los organismos suelen ser más susceptibles a los ataques de dichos agentes, sobre todo cuando se llevan cultivos larvarios en forma intensiva, que por efecto del estrés provocado por las altas densidades, reduce el potencial de defensa de los organismos (Morales, 2000).

El desarrollo de la microbiota del tracto digestivo es un proceso gradual que comienza después del nacimiento. En los animales terrestres, la microbiota materna es la fuente inicial de colonización bacteriana, mientras que en los animales acuáticos, ésta acción está determinada por su contacto con el ambiente circundante e influida por la ingesta de alimento, la secreción de hormonas y la absorción de nutrientes, así como por la aparición de proteínas y enzimas digestivas. Inicialmente, cepas anaerobias facultativas dominan en el intestino y posteriormente la variabilidad poblacional dependerá del tipo de dieta ingerida, la edad, la ubicación geográfica, los tratamientos con medicamentos y el estado general del organismo (Cahill, 1990; Isolauri *et al.*, 2001). En el caso particular del camarón blanco la colonización del tracto digestivo por microorganismos ocurre en el estadio de *nauplio* 5 ya que en este estadio presentan un poro anal con movimientos antiperistálticos (denominado “*anal drinking*”). Ésto ocurre antes de

que la boca se abra al medio exterior y comience la actividad normal de colonización (Simoes *et al.*, 2002).

El principal factor que influye en la variación de la microbiota gastrointestinal de los ambientes de cultivo es el estrés, el cual generalmente se relaciona con fluctuaciones en la salinidad y temperatura (Lea Mayer *et al.*, 1997), con la concentración de oxígeno, calidad y cantidad de alimento así como con la densidad de organismos (Suzuki *et al.*, 1989), además del manejo, higiene, y contaminantes en los sistemas de cultivo (Pal & Gupta, 1992; Straub & Dixon, 1993).

La ruptura del equilibrio dinámico de la biota intestinal es provocada por el estrés que se genera por las condiciones intensivas de la producción animal. Cuando descienden las concentraciones de bacterias beneficiosas, aparece la oportunidad para las bacterias menos deseables ó para que los patógenos potenciales se instalen y se multipliquen. En camarones el estrés está determinado por la calidad del agua, la alimentación, variación drástica de los parámetros (oxígeno, temperatura, salinidad, pH, etc.) y las prácticas de manejo (Morales, 2000). Las principales manifestaciones de estrés en un camarón peneido son: bacterias filamentosas y/o protozoos epibiotas, presencia de bacterias en la hemolinfa, enfermedad del caparazón, opacidad anormal de la musculatura, retraso de la muda, movimientos desorientados ó desordenados, y branquias negras. El estrés causa alteraciones en el metabolismo del animal, el cual se ve reflejado en el aprovechamiento de los nutrientes y por lo tanto, en el destino metabólico de estos últimos (Siderman, 1984).

La mayoría de las enfermedades que atacan a los camarones son especies del género *Vibrio* tales como: *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y *V. harveyi* presentando altas mortandades cuando en los camarones se rompe su equilibrio ó se encuentran con su sistema inmune suprimido (Morales, 2000). Los vibrios son agentes que forman parte de la microbiota natural del camarón al encontrarse en

camarones sanos, razón por la cual se les considera patógenos oportunistas al desencadenar enfermedades cuando el organismo presenta estrés (Morales, 2000). Es importante establecer la presencia y/o ausencia de especies de *Vibrio* debido a que el consumo del camarón blanco por el humano podría estar asociado a enfermedades de tipo diarreico.

Es ampliamente reconocido que los probióticos son capaces de mejorar la salud del hospedero por recuperación del equilibrio microbiano intestinal (Fuller, 1989; Gatesoupe, 1999) y que el género *Lactobacillus* contiene los principales microorganismos utilizados como probióticos (Axellsson, 1998). Estudios realizados a camarones demostraron que el género *Lactobacillus* es parte de la biota microbiana natural que se encuentran acompañándolo en todos sus estadios de vida y parte de dichas bacterias tienen potencial para usarse como probióticos en la acuicultura (García, 2003).

Durante toda la vida del animal, la microbiota presenta funciones metabólicas, tróficas y protectoras. La función metabólica tiene como finalidad ayudar en los procesos de digestión y absorción de nutrientes para proporcionar energía al organismo, mientras que la función trófica fomenta el crecimiento y la diferenciación celular, además de estimular el sistema inmune del organismo. Su función protectora se desarrolla desde el nacimiento, ya que actúa como la primera línea de defensa contra microorganismos patógenos, exógenos u oportunistas creando un *efecto barrera* (Isolauri *et al.*, 2001).

2.5 Bacterias ácido lácticas

Entre las principales bacterias que se encuentran en el tracto digestivo de los organismos se encuentran las bacterias ácido lácticas o BAL. Las BAL están constituidas por un grupo heterogéneo de bacterias Gram positivas, con un metabolismo estrictamente fermentativo (Holzapfel *et al.*, 2001), presentan forma

de cocos o bacilos microfílicos que producen mayoritariamente ácido láctico como producto final de la fermentación de los carbohidratos y cuentan con un bajo contenido de guanina y citosina (Axellsson, 1998) por lo que se les considera dentro del grupo denominado genéricamente como *Firmicutes*.

Las bacterias lácticas se localizan frecuentemente en hábitats ricos en nutrientes, caracterizados por la presencia de carbohidratos solubles y productos de la degradación de proteínas y vitaminas, y con bajas tensiones de oxígeno como por ejemplo, la leche y productos lácteos, productos cárnicos y vegetales fermentados, frutas y hortalizas frescas, ensilados, pescado y derivados de la pesca. Se han reportado como habitantes comunes del tracto gastrointestinal y mucosas del hombre, animales terrestres, peces, del estiércol y de aguas residuales urbanas e industriales. Han tenido un extenso uso en la fermentación de alimentos y como suplementos alimenticios por sus propiedades metabólicas, resistencia a procesos industriales y sustentabilidad en el producto final (Lindgren & Dobrogosz, 1990; Stiles, 1996; Cintas *et al.*, 2000).

Las BAL son consideradas importantes bacterias probióticas, esto es: microorganismos vivos, que cuando son ingeridos en cierto número, ejercen beneficios en la salud del hospedador más allá de la inherente nutrición. Varias cepas de las siguientes especies de *Lactobacillus* son reconocidas como probióticos: *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. lactis*, entre otros (Axellsson, 1998). La mayoría de los microorganismos probióticos propuestos para acuicultura pertenecen a las BAL, de los cuales los géneros utilizados comúnmente son *Lactobacillus* y *Lactococcus* (Holzapfel *et al.*, 1998; Strom & Olfasen, 1990, Ringo & Strom, 1994; Ringo *et al.*, 1998; Robertson *et al.*, 1998), una de las principales causas por las que las bacterias ácido lácticas son utilizadas como probióticos en la acuicultura, es por que presentan la capacidad de matar o inhibir el crecimiento de otras bacterias relacionadas con ellas, lo que se conoce como *antagonismo láctico* (Fredrickson & Stephanopoulos, 1981).

Los probióticos son una alternativa prometedora al uso de antibióticos, reduciendo las posibilidades de colonización y desarrollo de bacterias patógenas potenciales, bajo el principio de *exclusión competitiva* (Fuller, 1989; Gatesoupe, 1999).

2.6 La clase *Actinobacteria*

Los actinomicetos son un grupo de bacterias que por muchos años fueron confundidos con los hongos debido a su similitud morfológica (ej. formación de hifas y subsecuentemente micelio), tipo de reproducción y el crecimiento en medios de cultivo sólidos y líquidos. Su nombre proviene del griego *actis*: rayo de sol y *mykes*: hongo, por lo que dada su forma era fácil denominarlos “*hongos radiados*”. Numerosos estudios que incluyeron la comparación de secuencias del gen 16SrRNA ribosomal ubicó a los actinomicetos dentro del dominio Bacteria y dentro del *phyla* de las bacterias Gram positivas formando un grupo coherente taxonómica y evolutivamente (Figura 3). La clase *Actinobacteria* es un grupo diverso que incluye diferentes familias, géneros y subórdenes. En agosto del 2013, esta clase comprendía 51 familias y 253 géneros (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Los actinomicetos se encuentran distribuidos en prácticamente cualquier ecosistema, sin embargo el suelo contiene del 20 al 60% de la población actinobacteriana. El olor característico a tierra húmeda se debe a la producción de *geosmina*, un compuesto producido por actinomicetos y mayormente por miembros del género *Streptomyces* (Baltz, 2005).

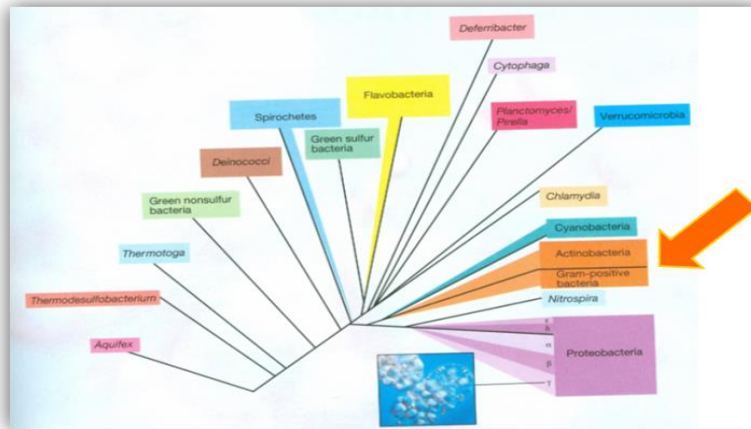


Figura 3. Árbol filogenético microbiano con base en secuencias del gen 16S ribosomal.
(Madigan & Martinko, 2006)

En el pasado se consideraba que las esporas producidas por algunas especies de actinomicetos eran arrastradas hacia ambientes acuáticos lo cual permitía explicar el por qué se les encontraba en lagunas y mares. En la actualidad existe suficiente evidencia que indica que varias especies son autóctonas del ambiente marino, en particular aquellas del género *Salinispora* (Mincer *et al.*, 2002; Maldonado *et al.*, 2005) y por lo tanto, presentan una serie de adaptaciones a este ecosistema. Los actinomicetos muestran una innata actividad metabólica para producir antibióticos, pigmentos, terpenos y enzimas extracelulares (Bérdy, 1995; Lazzarini *et al.*, 2000) teniendo como principal ejemplo al género *Streptomyces*.

La clase *Actinobacteria* presenta el contenido de GC más alto que se conoce en bacterias, son Gram positivas y su composición de DNA cae en el rango de 63 – 78% de Guanina y Citosina. Si bien en nuestro país estas bacterias son pobremente estudiadas, es reconocido a nivel mundial el elevado impacto económico de este grupo bacteriano como productores prolíficos de metabolitos secundarios (Bérdy, 1995; Lazzarini *et al.*, 2000; Strohl, 2004; Watve *et al.*, 2001) así como poseedores de rutas metabólicas únicas relacionadas con la formación de compuestos carotenoides (Tao *et al.*, 2007).

Los miembros del taxón son de interés por su importancia en la agricultura, ecología, industria y medicina (Strohl, 2004). Algunas Actinobacterias son serios patógenos de plantas y animales y otras fijan nitrógeno asociadas con plantas no leguminosas (Benson & Silvester, 1993; Locci, 1994). Actualmente las Actinobacterias, especialmente los actinomicetos formadores de esporas representan los procariontes con más valor económico y biotecnológico, produciendo más de la mitad de los componentes bioactivos conocidos (Lazzarini *et al.*, 2000), agentes antitumorales (Zheng *et al.*, 2000), enzimas (Oldfield *et al.*, 1998; Peczyńska-Czoch & Mordarski, 1988;), e inhibidores de enzimas (Umezawa, 1988).

Se reconocen mundialmente tres géneros de la clase *Actinobacteria* como los predominantes en el ambiente marino, estos son: *Micromonospora*, *Rhodococcus* y *Streptomyces* (Goodfellow & Haynes, 1984).

2.7 Caracterización microbiana

Una parte integral para la identificación de los microorganismos, es a través del empleo de pruebas que permitan evaluar las características fenotípicas y genotípicas de éstos.

El uso de las técnicas microbiológicas tradicionales no es suficiente para evaluar comunidades bacterianas en muestras ambientales ya que la proporción de células bacterianas cultivables en medios convencionales es del orden de 0.1% al 10% de la población total, esto es debido a las deficiencias de los estudios que se basaban en caracteres morfológicos, fisiológicos (necesidad de nutrientes) y estructurales (diferencias entre lípidos de membrana), para todos esos estudios era prerequisite el cultivo. Por estos motivos, los métodos moleculares pueden complementar los métodos tradicionales en el estudio y análisis de comunidades bacterianas (Cedeño, 2005). El aislamiento directo del material genético (ej. DNA)

de una muestra nos permite el acceso a los recursos potencialmente ilimitados de microorganismos no cultivables (Ferrer, 2004).

2.7.1 Aspectos fenotípicos de la caracterización microbiana

Análisis de la composición de la célula microbiana sugiere que cerca del 95% del peso seco de la célula está constituido por unos cuantos elementos tales como azufre, calcio, carbono, fósforo, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno, potasio, magnesio y fierro. Estos son los elementos necesarios para garantizar el crecimiento bacteriano, además de condiciones físicas tales como el pH, concentración de oxígeno, temperatura, presión atmosférica, salinidad y disponibilidad de agua (Prescott *et al.*, 1999; Madigan & Martinko, 2006).

En general, la característica nutricional más notable de los microorganismos es su extraordinaria flexibilidad con respecto a las fuentes de carbono debido a que son el principal constituyente de la materia celular. Prácticamente, no existe ninguna molécula orgánica natural que no pueda ser empleada metabólicamente por un microorganismo ya sea éste una arquea o una bacteria (Prescott *et al.*, 1999; Madigan & Martinko, 2006).

Después del carbono, el siguiente elemento necesario y el más abundante es el nitrógeno. En una bacteria alrededor del 12% de su peso seco es nitrógeno. El nitrógeno es utilizado para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular lo que lo convierte también en un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo bacteriano.

Por su importancia anterior, el carbono y el nitrógeno son considerados como *macronutrientes* y elementos necesarios para gran parte del crecimiento microbiano.

Entre las diferentes pruebas empleadas para la caracterización microbiana, la utilización de éstos dos macronutrientes ha sido evaluado de manera tradicional desde los años 60's para establecer una matriz o matrices que muestren el perfil metabólico del o de los microorganismos de estudio o interés (Sneath, 1957). Puesto que lo anterior es medido de "*manera visual*" y depende estrictamente de las características observables del microorganismo durante los tiempos de lectura de las pruebas en evaluación, esto es entonces conocido como una caracterización "*fenotípica microbiana*" (Logan, 1994).

La caracterización fenotípica de casi cualquier microorganismo estuvo en algún momento de su historia basada en observaciones morfológicas y, aunque la morfología es todavía una característica importante para la descripción de taxones, no puede ser exclusiva debido a las mínimas diferencias morfológicas presentes entre muchos géneros (Labeda, 1987).

2.7.2 Aspectos genotípicos de la caracterización microbiana

La caracterización genotípica de un microorganismo consiste en el estudio de su material genético y está basado principalmente en el empleo de secuencias de DNA.

Los RNA ribosómicos son moléculas excelentes para establecer las relaciones evolutivas entre los seres vivos. Estas moléculas son funcionalmente constantes, se encuentran universalmente distribuidas y su secuencia está moderadamente bien conservada a través de amplias distancias filogenéticas lo que permite establecer la posición evolutiva más probable existente entre los organismos de estudio o de comparación y favoreciendo entonces su identificación.

Existen tres genes de RNA ribosómico distribuidas a lo largo del operón de RNA y que en procariontes tiene diferentes tamaños: el gen 5S cuenta con un tamaño de 120 nucleótidos (nt), el gen 16S de 1500 nt y el gen 23S de 2900 nt. Estas moléculas cuentan con regiones altamente conservadas que permiten realizar alineamientos y por consecuencia, comparaciones directas. De forma experimental, el gen 16S es mucho más “manejable” con respecto al 23S por lo que se le ha empleado extensivamente para la construcción de bases de datos tanto de eucariontes como de procariontes. Estas bases de datos de libre acceso permiten la comparación inmediata de secuencias “desconocidas” contra toda la información contenida en ellas (Madigan & Martinko, 2006).

Técnicas basadas en la información genética de los microorganismos para lograr su identificación, por ejemplo, la secuenciación de su genoma o de algún gen en específico, permiten la amplificación (aumento en el número) de una secuencia definida del DNA a través de una técnica llamada Reacción en Cadena de la Polimerasa (**P**olymerase **C**hain **R**eaction; **PCR** del inglés) para posteriormente estudiarla. Es precisamente a partir de la obtención de un cultivo puro de un microorganismo que la técnica de PCR puede emplearse para amplificar directamente el gen que codifica el RNA ribosómico 16S.

2.7.2.1 Reacción en cadena Polimerasa (PCR)

Actualmente, los métodos más específicos e informativos empleados para clasificar a los microorganismos se basan en la determinación de secuencias de nucleótidos de regiones específicas de DNA, en concreto del gen del 16S ribosomal. Esta molécula está universalmente distribuida y es funcionalmente homóloga en cada organismo lo que hace que la comparación filogenética sea a partir de la identificación de regiones homólogas (Madigan & Martinko, 2006).

La PCR fue inventada por Kary Mullis en 1983 y su primera publicación fue hasta 1985. Dicha técnica se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa, la cual es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a partir de otra ya existente. Sus únicos requerimientos: son que existan nucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el ADN, y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que se requiere copiar para que sirva como cebadora ó “primer”. Esta técnica emplea mínimas cantidades de ADN (menor a 1 µg), puede ser visualizado aproximadamente en 3 horas y por último, los productos de la PCR pueden ser purificados para posteriormente ser secuenciados (Kim *et al.*, 2002).

La técnica de la PCR consta básicamente de 3 etapas fundamentales, dividida en varios ciclos (usualmente de 25 hasta 40) y comprende (Figura 4):

- Desnaturalización (95°C),
- Alineamiento (55–60°C),
- Extensión (72°C).

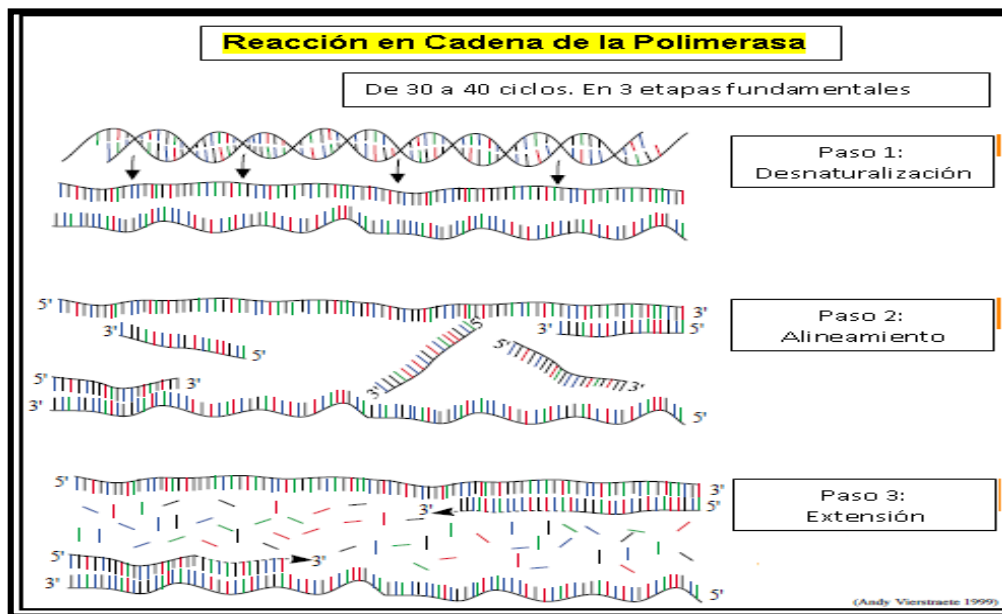


Figura 4. Pasos generales de la PCR

(<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcrsteps.gif> -agosto, 2009).

En una PCR, primeramente se desnaturaliza el ADN por medio de calor (95°C) para casi de inmediato bajar la temperatura de modo que los extremos 3' de las hebras sean separados hasta que se puedan aparear con oligodesoxinucleótidos complementarios, con la respectiva formación de híbridos estables con la molécula que funciona como molde o plantilla. Dichos oligonucleótidos funcionan como cebadores (también denominados oligonucleótidos, iniciadores o "primers") de modo que una polimerasa resistente a la desnaturalización por calor, la *Taq* polimerasa (aislada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* y resistente a altas temperaturas) extiende los extremos 3' de ambos oligonucleótidos empleando las hebras del ADN bicatenario como plantilla, proceso que se conoce como extensión y que usualmente se lleva a 72°C, por tratarse de la temperatura óptima de la *Taq* polimerasa (Metzker & Caskey, 2001; Kim *et al.*, 2002)

Una siguiente desnaturalización pone fin a un ciclo y da comienzo al siguiente. Al término del primer ciclo de reacción se obtienen dos copias idénticas bicatenarias del ácido nucleico original. Esto se repite alrededor de 25 a 40 veces. De esta manera se produce un aumento exponencial del número de copias de la secuencia específica igual a 2^n , donde n es el número de ciclos. Al término de todos los ciclos, la muestra se enfría a 4°C para su conservación y posterior análisis.

Para realizar la técnica de PCR se necesitan los siguientes reactivos (White, 2005; Newton & Graham 1997).

- **Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs)**, provee de nucleótidos (Adenina, Guanina, Citosina y Tiamina) a la reacción para la síntesis de ADN.
- **Oligonucleótidos**, secuencias cortas (normalmente de 18 a 22 nucleótidos) que se emplean para iniciar la reacción y actúan como secuencias complementarias a las dos hebras de ADN.

- **Iones de magnesio (Mg^{2+})**, una concentración óptima de cloruro de magnesio ($MgCl_2$), es requerida para la actividad y fidelidad de la enzima ADN polimerasa.
- **Búffer**, mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa.
- **ADN (*Taq*) polimerasa**, actúa empleando el ADN molde para sintetizar la cadena complementaria.
- **ADN molde**, es la muestra que se desea amplificar.
- **Termociclador**, aparato que va a mantener la temperatura necesaria en cada paso del ciclo de la PCR.

Los productos obtenidos por la PCR se visualizan mediante electroforesis en donde se espera observar tanto el tamaño del producto como el número de bandas.

El secuenciamiento del ADN o productos de PCR es la determinación del orden de bases en una molécula. Existen básicamente dos métodos: la degradación química o método de Maxam-Gilbert y la síntesis enzimática de la región a secuenciar o método de los dideoxi de Sanger. En secuenciación, un gran avance tecnológico lo constituyó la introducción de equipos automatizados los cuáles son usados para separar los productos de las reacciones de secuenciación, detectar y finalmente coleccionar (a través de una computadora) la información de las reacciones así como establecer el orden de las bases para automáticamente deducir la secuencia del fragmento de ADN de Interés (Hardin, 2001; Maldonado, 2009).

2.8 Planteamiento del Problema

Existen pocos reportes acerca de microorganismos habitantes en el tracto digestivo del camarón blanco *Litopenaeus vanamei*. Por lo tanto, resulta importante identificar a dichos microorganismos, conocer sus características así tratar de establecer su posible utilidad en el área alimentaria o industrial.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar la diversidad bacteriana cultivable que componen la comunidad bacteriana del tracto digestivo (estómago, hepatopáncreas e intestino) en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, empleando técnicas de identificación fenotípicas y genotípicas.

3.2 Objetivos Particulares

Para los microorganismos aislados:

- Establecer su perfil fenotípico al crecerlos en:
 - Diversas fuentes de Carbono
 - Diversas fuentes de Nitrógeno
 - Diversos compuestos de degradación
- Establecer la identidad de los aislados con base en su secuencia del gen 16S rRNA.

3.3HIPÓTESIS

Se aislarán bacterias provenientes del tracto digestivo del camarón que corresponderán a distintos grupos bacterianos sin existir alguno predominante y distintos de acuerdo con la dilución de donde provenga la muestra de estudio.

4. MATERIALES Y METODOS

En el presente trabajo se realizaron distintos análisis microbiológicos y moleculares para el aislamiento selectivo y para la caracterización fenotípica y genotípica de microorganismos obtenidos de las muestras del tracto digestivo de machos *Litopenaeus vannamei*.

El estudio microbiológico constó de las siguientes determinaciones:

- a) Utilización de medios de cultivo específicos
- b) Características morfológicas macroscópicas
- c) Utilización de fuentes de carbono
- d) Utilización de fuentes de nitrógeno
- e) Caracterización en pruebas de degradación

El estudio molecular constó de lo siguiente:

- a) Extracción de ADN
- b) Electroforesis horizontal
- c) PCR con primers 27f/1525r
- d) Secuenciamiento del producto de PCR

Un diagrama indicativo (diagrama de flujo) de las diferentes etapas que el presente trabajo de investigación incluyó se anexa a continuación (Figura 5).

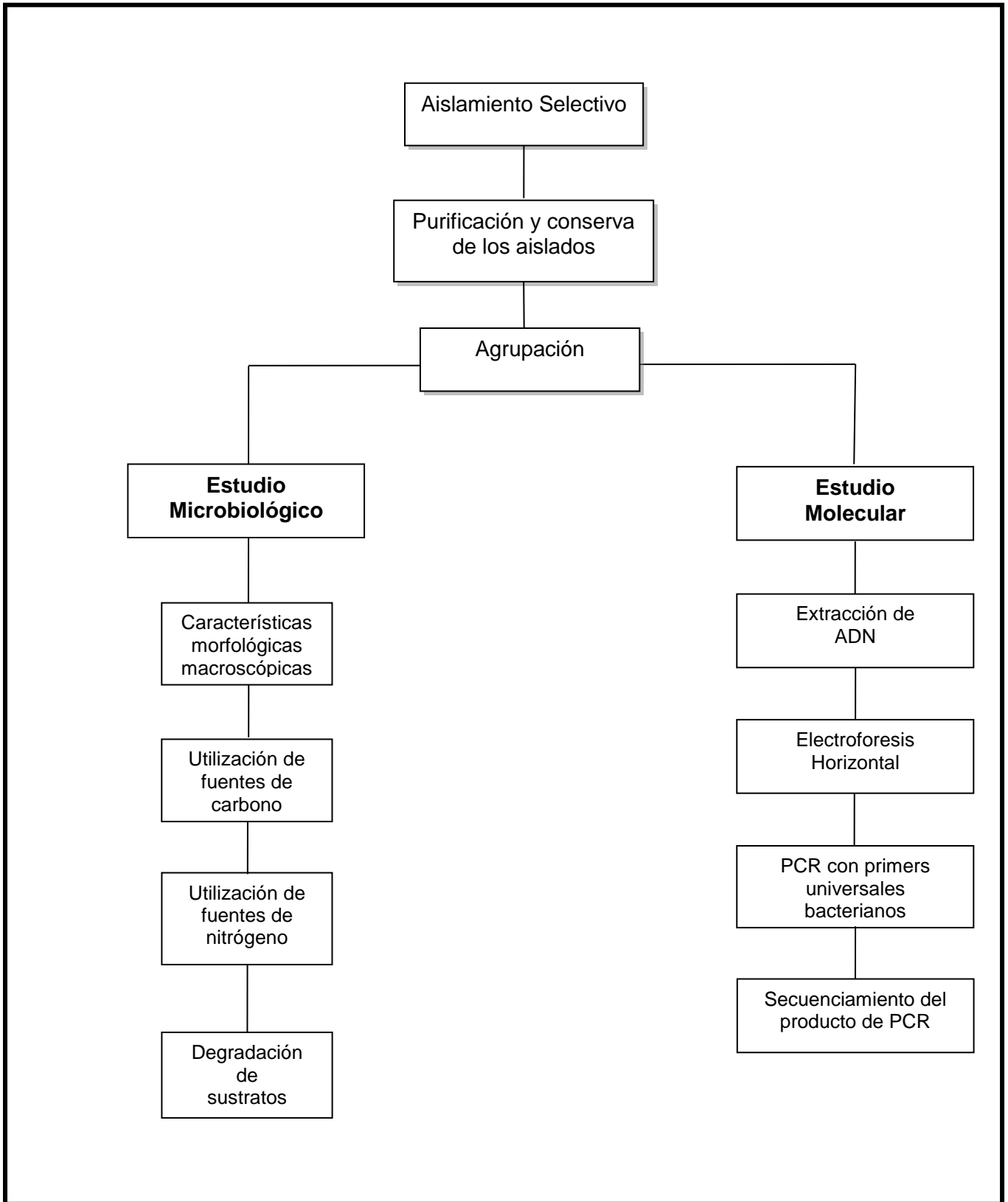


Figura 5. Esquema general del trabajo de investigación

4.1 Cultivo y aislamiento de cepas

Los organismos que se utilizaron pertenecen a la especie *Litopenaeus vannamei*, sexo machos, los cuales fueron adquiridos en la granja comercial “La Marca” en la etapa de postlarvas y alimentados hasta la etapa de juveniles en el área de estanques de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI), perteneciente a la UNAM en la comunidad de Sisal, Hunucmá, Yucatán.

Las muestras fueron obtenidas del tracto digestivo del camarón blanco y se realizaron dos diluciones tomando un gramo de peso y colocándolo en 9 mililitros de solución salina isotónica (todo en condiciones asépticas) hasta su empleo. Se generaron entonces tres muestras etiquetadas como se indica a continuación:

- Tubo Digestivo
- Tubo Digestivo 10^{-1}
- Tubo Digestivo 10^{-2}

Se preparó medio de cultivo GYEA y GYEA marino (Anexo 1). El medio “marino” indica que se empleó agua marina en lugar de agua destilada para su elaboración. De cada medio se realizó una dilución 1:100 para favorecer las condiciones oligotróficas que posiblemente los microorganismos encuentran en ambientes acuáticos. Se añadió un antibiótico (Penicilina $20\mu\text{g}/\text{mL}$) para tratar de favorecer el aislamiento de ciertos grupos bacterianos y limitar el crecimiento de bacterias “contaminantes”.

Cada muestra se sembró por duplicado en los 4 diferentes tipos de medio GYEA con una micropipeta p200 (Gilson, Francia) y una cantidad de $75\ \mu\text{L}$. Cada muestra se distribuyó homogéneamente en cada medio de cultivo con un asa en forma de L de forma circular, hacia arriba y hacia abajo.

Las cajas Petri se incubaron a $30\ ^\circ\text{C}$ y se observó el crecimiento a los 7 y 14 días. Se registró el crecimiento de las colonias así como las características

morfológicas. De las cajas Petri de aislamiento las colonias se resembraron en medio GYEA y GYEA marino (sin antibiótico) asignándoles un código para identificarles dejándose crecer por entre 7 y 9 días. Al pasar este tiempo se fueron registrando los crecimientos y características de cada aislado en una hoja de cálculo Excel (Microsoft, EUA) repitiéndose el procedimiento cuantas veces fuese necesario hasta obtener cultivos puros. A cada aislado puro se le tomó fotografía con una cámara digital (Sony, Japón) para agruparlos con base en sus características de crecimiento. De los grupos formados se designó un representante aleatoriamente al cual se le realizaron las pruebas fenotípicas y genotípicas como se describe a continuación.

4.2 Utilización de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno

Se evaluó el crecimiento de los microorganismos en 30 fuentes de carbono y 16 fuentes de nitrógeno (Tablas 1 y 2 respectivamente), todos obtenidos de Sigma-Aldrich, EUA.

Para la preparación de los medios de cultivo se pesaron 1 g de las fuentes de carbono y 0.1 g de las fuentes de nitrógeno y ambas se disolvieron en 20 mL de agua bidestilada. Por separado, se prepararon dos medios: ISP-9 (*International Streptomyces Project*, del inglés) para las fuentes de carbono y medio basal para las fuentes de nitrógeno (Shirling & Gottlieb, 1966; Anexos).

Cada una de las soluciones de las fuentes de carbono y nitrógeno fueron esterilizadas por tinalización (3 días consecutivos 100 °C por 30 minutos) mientras que los medios de cultivo se esterilizaron en un autoclave Sterilimatic a 15 libras de presión, a 121 °C durante 15 minutos. Una vez esterilizados ambas partes, es decir el medio de cultivo y la fuente de carbono y/o nitrógeno), se dejaron enfriar aproximadamente a 45°C y se mezclaron individualmente previo a verter en cajas Petri de plástico estériles.

Tabla 1. Fuentes de carbono seleccionadas para la caracterización fenotípica (concentración final de cada fuente de carbono: 1.0%).

	Fuentes de Carbono	Tipo		Fuentes de Carbono	Tipo
1	Acido Benzoico	Acido Carboxílico	16	Maltosa	Disacárido
2	Ácido Malónico	Ácido Dicarboxílico	17	Manitol	Poli-alcohol
3	Acido Mucico	Monosacarido	18	Manosa	Monosacárido
4	Acido Oxálico	Acido Carboxílico	19	Melobiosa	Disacárido
5	Acido Pirúvico		20	Melozitosa	Disacárido
6	Adonitol	Monosacárido	21	Pectina	Polisacárido
7	Arabinosa	Monosacárido	22	Rafinosa	Trisacárido
8	Celobiosa	Disacárido	23	Ramnosa	Monosacárido
9	Dextrano	Polisacárido	24	Ribosa	Monosacárido
10	Dextrosa	Monosacárido	25	Sorbitol	Polialcohol
11	Dulcitol	Polialcohol	26	Sorbosa	Monosacárido
12	Fructosa	Monosacárido	27	Sucrosa	Disacárido
13	Galactosa	Monosacárido	28	Trehalosa	Disacárido
14	Inositol	Polialcohol	29	Xilitol	Poli-alcohol
15	Lactosa	Disacárido	30	Xilosa	Monosacárido

Tabla 2. Fuentes de nitrógeno seleccionadas para la caracterización fenotípica (concentración final de cada fuente de nitrógeno: 0.1%).

	Fuentes de Nitrógeno	Tipo		Fuentes de Nitrógeno	Tipo
1	Ácido aspártico	Ácido	9	leucina	Alifático
2	Ácido glutámico	Ácido	10	Metionina	
3	Adenina	Base nitrogenada	11	Norleucina	
4	Alanina	Alifático	12	Ornitina	Dibásico
5	Arginina	Básico	13	Prolina	Alifático
6	Fenilalanina	Aromático	14	Serina	Hidroxilado
7	Histidina	Básico	15	Triptófano	Aromático
8	Isoleucina	Alifático	16	Valina	Alifático

Dos días antes del empleo de los medios con las fuentes de carbono y nitrógeno, se prepararon suspensiones de los microorganismos “representantes” de cada grupo tomando de 3 a 4 asadas de biomasa “fresca” (crecimiento en GYEA por 7-10 días) y colocándolos en tubos Eppendorf de 1.5 mL que contenían solución salina isotónica estéril. Cada suspensión se adecuó al tubo 0.5 de la escala de McFarland, de manera que todas las suspensiones de microorganismos estuvieran lo más homogéneas posibles y de concentración conocida. Cada suspensión se guardó en refrigeración hasta su uso.

A cada caja Petri con las fuentes de carbono y de nitrógeno se le agregaron 10 microlitros de suspensión de microorganismo colocado con una pipeta Gilson (Francia) dejándose incubar a 30°C revisando las cajas a los 7, 14 y 21 días nuevamente en una hoja de cálculo de Excel (Microsoft EUA).

La ponderación de los valores presentados en las tablas de la caracterización fenotípica se basó principalmente en el desarrollo o crecimiento de cada uno de los microorganismos al comparar contra dos o tres cajas Petri dependiendo si la evaluación era de las fuentes de carbono o de nitrógeno. Para las fuentes de carbono la comparación se realizó contra dos cajas Petri, una cuya fuente de carbono es Glucosa (Dextrosa) y considerada como un control “positivo” y contra una caja Petri a la que no se le agregó ninguna fuente de carbono (control negativo). Para las fuentes de nitrógeno solo se compara contra una caja que contiene agua en lugar de una fuente de nitrógeno (control negativo). La ausencia o presencia de crecimiento-desarrollo se indicó con base en un sistema de cruces con un máximo de 5 cruces (xxxxx) para excelente y (-) para la ausencia de crecimiento y con diferentes rangos de desarrollo (cruces) entre los extremos.

4.3 Pruebas de degradación de sustratos

Empleando el medio GYEA como base, se prepararon cajas Petri a las cuáles se les agregó el compuesto por degradar previo a su esterilización en autoclave bajo las condiciones indicadas previamente. Una vez pasado el tiempo de esterilización y que la temperatura del medio estuviera alrededor de los 45°C,

éste se vació en cajas Petri para posteriormente ser inoculado con suspensiones (10 microlitros) de los microorganismos de estudio. Los compuestos empleados en las pruebas de degradación se indican en la siguiente tabla (Tabla 3).

Tabla 3. Compuestos empleados para las pruebas de degradación indicándose entre paréntesis la concentración final de cada compuesto en el medio.

Adenina (0.4%)
Caseína (0.5%)
Hipoxantina (0.4%)
Tirosina (0.5%)
Xantina (0.4%)

4.4 Extracción de ADN de los aislados

En tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL (previamente marcados con la clave correspondiente a cada cepa), se homogeneizaron dos asadas de biomasa fresca de microorganismos con 100 µg de perlas de vidrio y 500 µL de búffer Glucosa-Tris-EDTA (ambos, Sigma-Aldrich, EUA). Posteriormente se colocaron los tubos Eppendorf en el refrigerador (4°C) durante 12 horas. Al transcurrir el tiempo, se retiraron del refrigerador y se agitaron constantemente en un vórtex (Daigger-Genie 3, EUA) a velocidad máxima durante 15 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo, los tubos se centrifugaron por 15 minutos a 14,500 rpm en una minicentrífuga MiniSpin-Plus (Eppendorf, EUA) recuperándose ahora el sobrenadante de cada tubo (aprox. 400 µL) que se transfirieron a un nuevo tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL. A cada tubo con el sobrenadante se le adicionó un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1 v/v respectivamente; Sigma-Aldrich, EUA) mezclándose los contenidos por inversión y en el vórtex durante 5 segundos. Luego de centrifugarlos por 15 minutos a 14,500 rpm en la minicentrífuga indicada previamente, se observaron dos fases y se volvió a transferir la superior a un nuevo tubo Eppendorf con la ayuda de una micropipeta Gilson (Francia). El procedimiento de extracción de los ácidos nucleicos se repitió

una segunda ocasión a fin de eliminar la mayor cantidad de proteínas que se observa como una interfase o película blanquecina entre ambas fases.

Una vez realizadas las dos extracciones, se agregó un volumen doble al presente en cada tubo de etanol frío al 99% (Sigma-Aldrich, EUA) para precipitar los ácidos nucleicos y se dejaron en el refrigerador por 12 horas. Transcurrido el tiempo, los tubos nuevamente se centrifugaron por 15 minutos a 14,500 rpm en la misma minicentrífuga Mini-Spin Plus y se decantó el sobrenadante cuidando de no traerse una “pastilla” blanca que es indicativa de la precipitación de los ácidos nucleicos.

La pastilla de material genético “pegada” en una de las paredes del tubo Eppendorf se lavó con 200 μ L de etanol al 70%, se repitió este proceso en dos ocasiones. Los tubos nuevamente se centrifugaron a 14,500 rpm durante 15 minutos para posteriormente eliminar el remanente de etanol de lavado por decantación y dejando los tubos secar a temperatura ambiente por inversión sobre papel absorbente durante 12 horas. El material genético se reconstituyó en 100 μ L de búffer 1x Tris-EDTA (TE) y su visualización se realizó por electroforesis horizontal.

4.5 Electroforesis Horizontal

Para la preparación del gel, en una balanza analítica (Mettler Toledo, EUA) se pesó 1 g de agarosa (Bioline, EUA), la cual se homogeneizó con 100 mL de buffer Tris-ácido bórico-EDTA (TBE) 0.5X en un vaso de precipitados de 250 mL calentándose hasta disolución en un horno de microondas (LG, México). A ésta disolución se agregó 1 μ L de Bromuro de etidio (EtBr; Sigma-Aldrich, EUA) y la agarosa se dejó enfriar durante 10 minutos en una campana de extracción. Una vez transcurrido este tiempo se vertió en una cámara de electroforesis horizontal con peines de plástico de 20 pozos. Una vez polimerizado el gel (30-45 minutos) se retiraron los peines, se colocó en la cámara de electroforesis y se agregó búffer

TBE 0.5X hasta cubrirlo completamente. Del material genético reconstituido se tomaron 2 μ L que se mezclaron con igual volumen de búffer de carga depositándose cuidadosamente en cada uno de los pozos generados al retirar los peines del gel. En los extremos del gel se colocaron (2 μ l) de marcador molecular (1000 pares de bases; Bioline, EUA). Los respectivos electrodos (+ y -) se conectaron a la cámara de electroforesis y a la fuente de poder, ésta última programándose a 100 Voltios por un tiempo de 35 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de electroforesis, el gel se observó bajo un transiluminador de luz ultravioleta (Probiotek, México). La imagen resultante se capturó en un fotodocumentador UVISAVE (Probiotek, México) y se guardó en una memoria CompactFlash de 256 MB (Kingston Technology, EUA) en formato TIFF. Las imágenes se transfirieron al disco duro de una computadora PC para visualizarse con cualquier software de imágenes. La presencia del material genético luego de la electroforesis horizontal y se identificó el DNA por su visualización como una banda de alto peso molecular al compararse contra el carril o los carriles del marcador de peso molecular.

4.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Una vez comprobado que se hubiera extraído el DNA de cada uno de los microorganismos representativos de cada grupo formado, se realizó una PCR para amplificar el gen 16S rRNA empleando los oligos 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGGTCAG-3') y 1525r (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') específicos para procariotes. La mezcla de reacción (Tabla 5) fue la empleada para cada tubo de reacción y se repitió o se realizaron ligeras modificaciones hasta obtener un producto de PCR de buena calidad y del tamaño esperado (aprox. 1500 pares de bases (pb)).

El programa de amplificación para la PCR se llevó a cabo en un termociclador Labnet (Labnet International, EUA), que consistió en las siguientes condiciones de reacción: 1 ciclo de 95°C por 10 minutos (*desnaturalización inicial*),

seguido de 35 ciclos compuestos por 95°C por 1 minuto (*desnaturalización*), 60°C por 1 minuto (*alineamiento*) y 72°C por 1 minuto (*extensión*). Una vez terminado el tiempo de la reacción de amplificación, el producto de PCR de cada muestra se examinó por electroforesis horizontal en un gel al 1% de agarosa, teñido nuevamente con EtBr. Este gel se corrió manera similar a lo descrito previamente para el gel de electroforesis del material genético pero empleando 5 microlitros del producto de PCR de cada representante de los grupos microbianos y colocando en cada pozo del gel un total de 7 microlitros. Una vez concluido el corrimiento se observó el gel bajo un transiluminador UV esperando un producto de PCR de aproximadamente 1500 pb por comparación con el carril o los carriles del marcador de peso molecular.

Tabla 5. Concentración y cantidades de los reactivos de la mezcla de PCR.

Reactivo	Volumen (µL)
Búffer (10X; Bioline, EUA)	5
MgCl ₂ (50 mM; Bioline, EUA)	1.5
dNTP's (10 mM; Bioline, EUA)	1.25
Primer 27f	0.5
Primer 1525r	0.5
ADN	1
<i>Taq</i> polimerasa (Bioline, EUA)	0.2
H ₂ O	40.05
Total	50

4.7 Purificación de los productos de PCR

La purificación de los productos de PCR se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor de acuerdo al manual QIAquick PCR Purification kit (Qiagen Ltd, Alemania) como se describe brevemente a continuación.

Al producto de PCR restante, es decir 45 microlitros se adicionaron 5 volúmenes de Buffer PBI por 1 volumen de PCR, es decir, 250 μ L PBI para 50 μ L PCR y se transfirieron a una columna QIAquick de 2mL que se centrifugó por entre 30 y 60 segundos a 13000 rpm.

La columna se transfiere ahora a unos tubos nuevos de 1.5mL y se le enjuaga adicionando 0.75 mL del Buffer PE volviéndose a centrifugar por entre 30 y 60 segundos nuevamente. Este paso se repite hasta que la columna quede completamente seca (que no haya mas líquido saliendo de la columna al término del período de centrifugación). La columna “seca” se transfiere ahora a otro tubo Eppendorf de 1.5 mL nuevo y se le adicionan 50 μ L de Buffer EB en el centro de la membrana para centrifugar durante un minuto. El producto de PCR purificado (aprox. 45 microlitros) se colecta en la columna y se corre ahora un gel de agarosa (electroforesis horizontal) en la proporción 1 μ L de Buffer de carga y 5 μ L del producto de PCR purificado en las mismas condiciones que las descritas previamente para cada electroforesis horizontal.

4.8 Secuenciamiento del producto de PCR

Los productos purificados se conservaron a una temperatura de -20°C hasta obtenerse los productos de todos los representantes de cada grupo y se llevaron al Instituto de Biología de la UNAM para su procesamiento de acuerdo a las indicaciones de la M. en C. Laura Márquez Valdemar, responsable del laboratorio de Biología Molecular de dicho Instituto.

4.9 Comparación empleando GenBank y BLAST

Las secuencias obtenidas en el Instituto de Biología fueron enviadas en archivos de formato ZIP por correo electrónico los cuales al descomprimirse mostraban las secuencias resultantes en formato ABI. Los archivos en formato ABI

se leyeron con el Software Chromas Pro (Technelysium Pty Ltd, Australia) y el texto de la secuencias se exportó en formato Texto al procesador de textos Word (Microsoft, EUA). El texto correspondiente a cada una de las secuencias obtenidas se copió en dos ventanas, la primera de ellas la de la opción BLAST del sitio GenBank y la segunda de ellas la de la base de datos del sitio EzTaxon (Kim *et al.*, 2012).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 22 cajas Petri del aislamiento selectivo, solamente en 16 de ellas se obtuvieron colonias como se indica en la tabla 6 así como las características macroscópicas. Debe destacarse que la morfología colonial fue variada dependiendo del medio empleado. Mientras en algunos casos las colonias eran grandes color carne, en otros casos los microorganismos aislados formaron colonias amarillas, anaranjadas o inclusive blancas, lo que sugiere e indica que la diversidad de bacterias recuperadas fue amplia (Tabla 6). En algunos casos, las cajas Petri presentaban un olor penetrante lo que sugiere además que algunos de los microorganismos mostraban alta capacidad proteolítica posiblemente del extracto de levadura, un componente primordial del medio GYEA. El total de colonias que se obtuvieron en el experimento resultó ser de 86.

De los 86 microorganismos que aparecieron en las cajas Petri del aislamiento selectivo, 77 surgieron a partir de la muestra Tubo digestivo “sin diluir”. El que en la caja Petri Tubo Digestivo 1º no hayan aparecido colonias seguramente sugiere que hubo algún problema con el procedimiento experimental pues su duplicado, es decir la caja denominada caja Petri Tubo Digestivo 2º se aislaron 10 colonias.

En esta primera etapa del trabajo, no se observó ningún patrón para el aislamiento de microorganismos. Es decir, indistintamente se aislaron bacterias tanto de las cajas Petri con medio GYEA preparado con agua destilada como con agua marina. Lo anterior es interesante pues ninguno de los aislados mostraba una “dependencia” para crecer en medio de cultivo con agua marina, lo que sí ha sido reportado previamente para algunos grupos bacterianos. Cabe destacarse, sin embargo, que en el medio preparado con agua marina se aislaron un mayor número de colonias independientemente si el medio se encontraba diluido o no. En estos medios se aislaron un total de 59 aislados, es decir más de la mitad del total de los aislados de esta etapa del trabajo experimental. Además de que los números entre un duplicado y otro fueron prácticamente idénticos: 13 aislados contra 11 (cajas Tubo Digestivo GYEA•) y 17 aislados contra 18 (cajas Tubo

Digestivo GYEA•1:100). El empleo de las diluciones del Tubo Digestivo, ya fueran éstas la dilución 10^{-1} o la dilución 10^{-2} no ofreció ninguna diferencia pues se obtuvieron únicamente 5 y 4 colonias respectivamente.

Tabla 6. Características macroscópicas de todos los aislados observados en las cajas de aislamiento

MUESTRA	MEDIO	No. COLONIAS	CARECTERISTICAS GENERALES
Tubo Digestivo 1°	GYEA	6	Colonias grandes color carne muy tenue. Se observan brillosas, con textura viscosa y suaves. De superficie plana y sin forma definida
Tubo Digestivo 2°	GYEA	2	Se observa 1 colonia muy pequeña de color anaranjado, de forma circular, suave y brillante. Se observa 1 colonia grande de color carne, sin forma definida, de superficie plana, brillante, de textura suave y viscosa.
Tubo Digestivo 1°	GYEA (1:100)	0	
Tubo Digestivo 2°	GYEA (1:100)	10	10 colonias pequeñas color amarillo muy tenue, de superficie plana, forma circular, apariencia viscosas, suaves y brillosas
Tubo Digestivo 1°	GYEA •	13	6 colonias pequeñas de color amarillo, de forma circular, de apariencia brillante y viscosa 2 colonias pequeñas de color naranja, de forma circular, apariencia viscosa, brillante y suave 2 colonias grandes color carne, sin forma definida, planas, apariencia suave y opacas 3 colonias pequeñas color amarillo tenue, sin forma definida, apariencia volcánica y suaves
Tubo Digestivo 2°	GYEA •☒	11	2 colonias pequeñas color naranja, circulares, apariencia suave, brillosas 9 colonias pequeñas color amarillo, circulares, apariencia suave, brillosas y viscosas
Tubo Digestivo 1°	GYEA •☒ (1:100)	17	11 colonias pequeñas color amarillo, circulares, de apariencia viscosa y suaves 6 colonias grandes color carne, circulares, de apariencia plana, suaves y viscosas
Tubo Digestivo 2°	GYEA •☒ (1:100)	18	9 colonias pequeñas de color amarillo, circulares, apariencia plana, suaves y viscosas 9 colonias grandes de color carne, apariencia dura, plana y brillante, sin forma definida
Tubo Digestivo 10^{-1} 1°	GYEA	1	Colonia grande color blanco, de forma circular, brillante, apariencia suave y viscosa, de superficie plana
Tubo Digestivo 10^{-1} 2°	GYEA	1	Colonia grande sin color definido, brillante, suave y viscosa, de apariencia volcánica
Tubo Digestivo 10^{-1} 1°	GYEA (1:100)	0	
Tubo Digestivo 10^{-1} 2°	GYEA (1:100)	1	Colonia pequeña de color carne muy tenue, de superficie plana, de apariencia suave
Tubo Digestivo 10^{-1} 1° y 2°	GYEA •☒	0	
Tubo Digestivo 10^{-1} 1°	GYEA •☒ (1:100)	1	Colonia pequeña color carne, circular, brillante, de superficie plana y apariencia suave y viscosa
Tubo Digestivo 10^{-1} 2°	GYEA •☒ (1:100)	1	Colonia ligeramente grande color carne, de forma circular, brillante, de superficie plana, de apariencia suave y viscosa
Tubo Digestivo 10^{-2} 1°	GYEA	1	Colonia pequeña sin color definido, se apariencia volcánica, opaca, extendida a lo largo de toda la orilla del plato. Presenta características de basilo
Tubo Digestivo 10^{-2} 2°	GYEA	1	Colonia pequeña sin color definido, se apariencia volcánica, opaca, extendida a lo largo de toda la orilla del plato. Presenta características de basilo
Tubo Digestivo 10^{-2} 1° y 2°	GYEA (1:100)	0	
Tubo Digestivo 10^{-2} 1°	GYEA •☒	1	Colonia pequeña sin color definido, se apariencia volcánica, opaca, extendida a lo largo de toda la orilla del plato. Presenta características de basilo
Tubo Digestivo 10^{-2} 2°	GYEA •☒	0	
Tubo Digestivo 10^{-2} 1°	GYEA •☒ (1:100)	0	
Tubo Digestivo 10^{-2} 2°	GYEA •☒ (1:100)	1	Colonia pequeña sin color definido, se apariencia volcánica, opaca, extendida a lo largo de toda la orilla del plato. Presenta características de basilo

Una vez registradas las características macroscópicas de todas las colonias se procedió a recuperar la mayor cantidad de éstas siempre y cuando tuvieran

características morfológicas distintas así como que su “origen” fuera de una caja de aislamiento distinta. De esta forma, se terminó trabajando con 25 aislados que se etiquetaron de acuerdo a la caja de aislamiento (tabla 7).

Tabla 7. Relación muestra-código

Muestra	Medio	Replica	Código
Tubo digestivo	GYEA	1°	KEG-AA-01
Tubo digestivo	GYEA	1°	KEG-AA-02
Tubo digestivo	GYEA	2°	KEG-AB-01
Tubo digestivo	GYEA	2°	KEG-AB-02
Tubo digestivo	GYEA (1:100)	2°	KEG-AC-01
Tubo digestivo	GYEA •	1°	KEG-AD-01
Tubo digestivo	GYEA •	1°	KEG-AD-02
Tubo digestivo	GYEA •	1°	KEG-AD-03
Tubo digestivo	GYEA •	1°	KEG-AD-04
Tubo digestivo	GYEA •	2°	KEG-AE-01
Tubo digestivo	GYEA •	2°	KEG-AE-02
Tubo digestivo	GYEA •	2°	KEG-AE-03
Tubo digestivo	GYEA •	2°	KEG-AE-04
Tubo digestivo	GYEA •	2°	KEG-AE-05
Tubo digestivo	GYEA •	2°	KEG-AE-06
Tubo digestivo	GYEA • (1:100)	1°	KEG-AF-01
Tubo digestivo	GYEA • (1:100)	1°	KEG-AF-02
Tubo digestivo	GYEA • (1:100)	2°	KEG-AG-01
Tubo digestivo	GYEA • (1:100)	2°	KEG-AG-02
Tubo digestivo 10-1	GYEA	2°	KEG-AH-01
Tubo digestivo 10-1	GYEA	2°	KEG-AH-02
Tubo digestivo 10-1	GYEA (1:100)	2°	KEG-AI-01
Tubo digestivo 10-1	GYEA • (1:100)	1°	KEG-AJ-01
Tubo digestivo 10-1	GYEA • (1:100)	2°	KEG-AK-01
Tubo digestivo 10-2	GYEA •	1°	KEG-AL-01

Las características particulares de cada aislado se resumen en la tabla 8, posteriormente en la tabla 9 se observan las imágenes de cada uno de estos aislados. Los grupos morfológicos se indican en la tabla siguiente (tabla 10). A partir de este agrupamiento se escogió un representante para cada uno de los grupos generados como también se indica en la tabla 10.

Tabla 8. Características generales del Aislamiento

Código	Características Generales
KEG-AA-01	Crecimiento abundante, incoloro, de apariencia suave, viscosa y de superficie plana, brillante
KEG-AA-02	Crecimiento regular, incoloro, de apariencia suave, viscosa y de superficie plana y brillante
KEG-AB-01	Crecimiento abundante de color amarillo, con brillo, de apariencia suave, viscosa, y en relieve
KEG-AB-02	Crecimiento abundante, incoloro, de apariencia suave, viscosa y de superficie plana, brillante
KEG-AC-01	Crecimiento regular, de color blanco, en relieve, de apariencia suave y seca. Presencia de basilo
KEG-AD-01	Crecimiento abundante de color amarillo, con brillo, de apariencia suave, viscosa, y en relieve
KEG-AD-02	Crecimiento abundante de color amarillo en un tono mostaza, de apariencia suave y viscosa, de superficie plana
KEG-AD-03	Muy poco crecimiento con un ligero tono de color blanco, opaco. Crecimiento en pequeñas colonias aisladas, de apariencia suave
KEG-AD-04	Muy poco crecimiento con un ligero tono de color blanco, opaco. Crecimiento en pequeñas colonias aisladas, de apariencia suave
KEG-AE-01	Crecimiento abundante de color carne, muy tenue la coloración, brillante, y de apariencia suave y viscosa.
KEG-AE-02	Crecimiento abundante de color amarillo en un tono mostaza, de apariencia suave y viscosa, de superficie plana
KEG-AE-03	Crecimiento abundante de color amarillo en un tono mostaza, de apariencia suave y viscosa, de superficie plana
KEG-AE-04	Muy poco crecimiento con un ligero tono de color blanco, opaco. Crecimiento en pequeñas colonias aisladas, de apariencia suave
KEG-AE-05	Crecimiento regular de color amarillo muy claro, sin brillo, de superficie plana, de apariencia suave únicamente
KEG-AE-06	Crecimiento abundante de color amarillo, de apariencia suave y seca, crecimiento en relieve.
KEG-AF-01	Poco crecimiento de color amarillo claro un poco brillante, de apariencia suave y viscosa, crecimiento en relieve.
KEG-AF-02	Muy poco crecimiento con un ligero tono de color blanco, opaco. Crecimiento en pequeñas colonias aisladas, de apariencia suave
KEG-AG-01	Poco crecimiento de color naranja muy tenue, con brillo, de apariencia suave y viscosa
KEG-AG-02	Poco Crecimiento de color amarillo
KEG-AH-01	Poco crecimiento color blanco, de apariencia seca y suave
KEG-AH-02	Crecimiento abundante sin coloración, de apariencia seca, en relieve. Presencia de basilo
KEG-AI-01	Crecimiento abundante sin coloración, de apariencia seca, en relieve. Presencia de basilo
KEG-AJ-01	Muy poco crecimiento con un ligero tono de color blanco, opaco. Crecimiento en pequeñas colonias aisladas, de apariencia suave
KEG-AK-01	Poco crecimiento de color naranja, de superficie plana, de apariencia suave y viscosa
KEG-AL-01	Crecimiento abundante sin coloración, de apariencia seca, en relieve. Presencia de basilo

Tabla 9. Relación Imagen-Código de cada aislado.

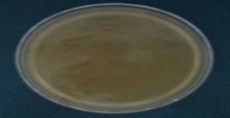
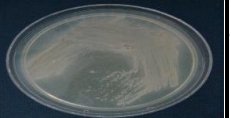
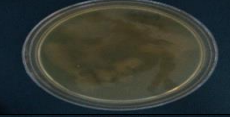
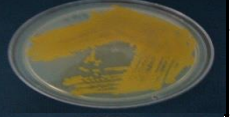


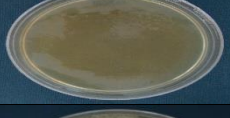
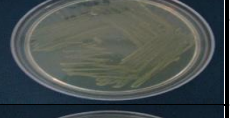

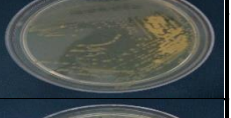

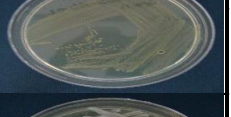
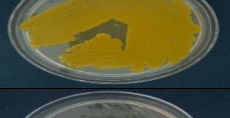


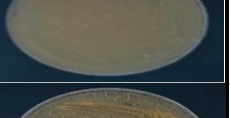


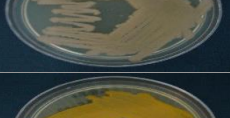

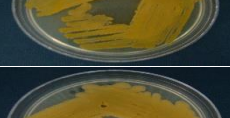
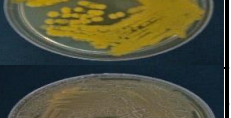

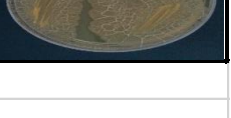

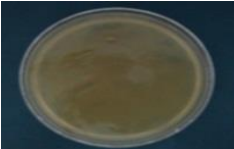

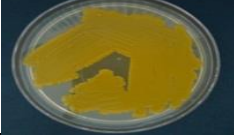









Código	Imagen	Codigo	Imagen
KEG-AA-01		KEG-AE-05	
KEG-AA-02		KEG-AE-06	
KEG-AB-01		KEG-AF-01	
KEG-AB-02		KEG-AF-02	
KEG-AC-01		KEG-AG-01	
KEG-AD-01		KEG-AG-02	
KEG-AD-02		KEG-AH-01	
KEG-AD-03		KEG-AH-02	
KEG-AD-04		KEG-AI-01	
KEG-AE-01		KEG-AJ-01	
KEG-AE-02		KEG-AK-01	
KEG-AE-03		KEG-AL-01	
KEG-AE-04			

Tabla 10. Generación de grupos con base en sus características morfológicas

Grupo	Codigos	Representante	Foto Representante
Grupo 1	KEG-AA-01	KEG-AA-01	
	KEG-AA-02		
	KEG-AB-02		
Grupo 2	KEG-AB-01	KEG-AD-01	
	KEG-AD-01		
Grupo 3	KEG-AD-02	KEG-AD-02	
	KEG-AE-02		
	KEG-AE-03		
Grupo 4	KEG-AD-03	KEG-AD-04	
	KEG-AD-04		
	KEG-AE-04		
	KEG-AF-02		
	KEG-AJ-01		
Grupo 5	KEG-AE-01	KEG-AE-01	
Grupo 6	KEG-AE-05	KEG-AE-05	
Grupo 7	KEG-AE-06	KEG-AE-06	
Grupo 8	KEG-AF-01	KEG-AF-01	
Grupo 9	KEG-AH-01	KEG-AH-01	
Grupo 10	KEG-AG-01	KEG-AG-01	
Grupo 11	KEG-AG-02	KEG-AG-02	
Grupo 12	KEG-AK-01	KEG-AK-01	

Los aislados KEG-AC-01, KEG-AH-02, KEG-AI-01 y KEG-AL-01 dejaron de crecer luego de varias resiembras a pesar de diversos intentos en otros medios de cultivo. Lo anterior hizo que del número “original” de 25 aislados tuviera que haber una reducción a 21 los cuáles se agruparon en 12 “grupos” morfológicos, muchos de ellos con un único representante (“grupos” morfológicos del 5 al 12, tabla 9).

A los representantes de estos 12 grupos se les extrajo DNA satisfactoriamente, de acuerdo al protocolo de extracción de DNA descrito en la sección de materiales y métodos. La figura 6 muestra la extracción del material genético de cada uno de los representantes morfológicos luego de una electroforesis horizontal.

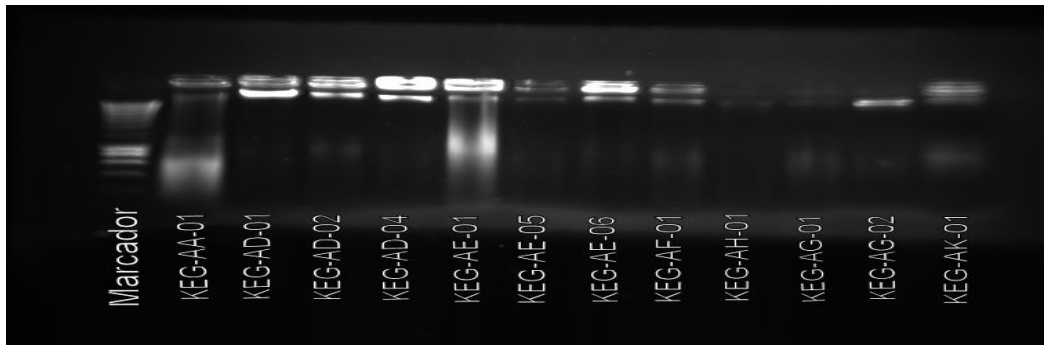


Figura 6. ADN extraído a los representantes de los 12 grupos.

A pesar de trabajar con el material genético de los 12 representantes (Figura 6), solamente se logró la amplificación de 7 de ellos, específicamente de los grupos 2, 3, 4, 8, 9, 11 y 12. En la Figura 7 se observan los productos de PCR, con aquellas muestras que dieron positivas así como negativas.

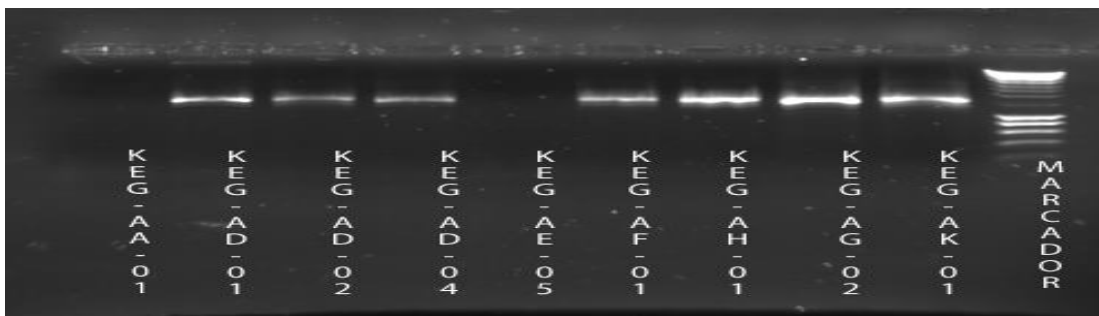


Figura 7. Producto de PCR 27f/1525r.

Los resultados positivos para los productos de PCR fueron para 7 de los grupos, estos son el Grupo 2 (KEG-AD-01), grupo 3 (KEG-AD-02), grupo 4 (KEG-AD-04), grupo 8 (KEG-AF-01), grupo 9 (KEG-AH-01), grupo 11 (KEG-AG-02) y 12 (KEG-AK-01). Estos 7 representantes se purificaron para mandarlos a secuenciar al Instituto de Biología y en la figura 8 se observan los productos de purificación de PCR de los grupos ya mencionados anteriormente.

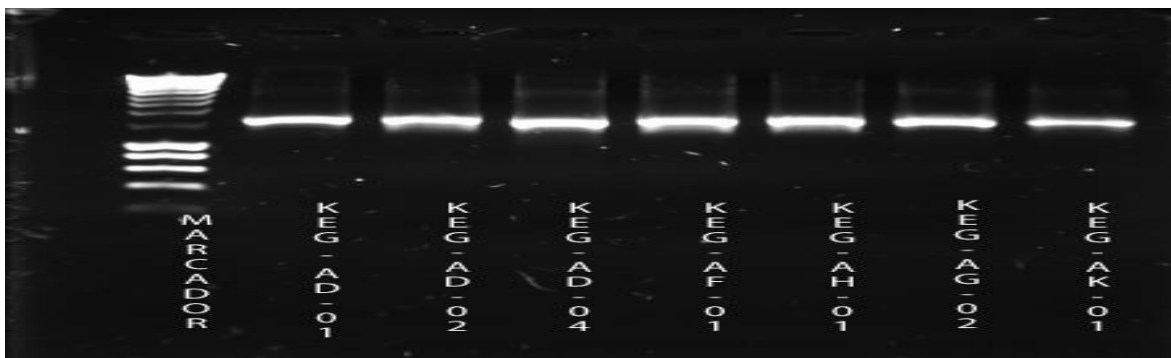


Figura 8. Productos de purificación de PCR.

Los productos mandados a secuenciar al Instituto de Biología, se recibieron en archivos electrónicos los cuales se capturaron y se compararon con la base de datos de BLAST y posteriormente con EzTaxon, para poder obtener mejores referencias sobre los microorganismos obtenidos. Los resultados obtenidos para ambas comparaciones se encuentran en la sección de Anexos y un resumen de los resultados obtenidos en la siguiente lista:

- KEG-AD-01 (Grupo 2) *Serinicoccus chungangensis*
- KEG-AD-02 (Grupo 3) *Halobacillus truperi*
- KEG-AD-04 (Grupo 4) *Demequina globuliformis*
- KEG-AF-01 (Grupo 8) *Halobacillus truperi*
- KEG-AH-01 (Grupo 9) *Staphylococcus epidermidis*
- KEG-AG-02 (Grupo 11) *Demequina globuliformis*
- KEG-AK-01 (Grupo 12) *Bacillus hwajinpoensis*

El hecho de que las secuencias de los representantes de los Grupos 3 y 4 correspondieran con las de los Grupo 8 y 11 (*Halobacillus truperi* y *Demequina globuliformis*, respectivamente) hizo que para las pruebas fenotípicas solo se tomaran 5 representantes “diferentes” con los resultados totales de crecimiento en el Anexo 9.4.

Adicionalmente, se puede observar que dos representantes de grupo pertenecen a la clase Actinobacteria, es decir a los géneros *Demequina* y *Serinicoccus* mientras que las otras secuencias corresponden al grupo bacteriano conocido genéricamente como “Firmicutes”, es decir bacterias con un bajo contenido de Guanina y Citocina. Es interesante resaltar que el género *Hallobacillus* es usualmente mencionado o relacionado a las bacterias lácticas o BAL.

Con los resultados de las pruebas fenotípicas para aquellos aislados que por secuencia pertenecieron a la clase Actinobacteria y con base en información bibliográfica se realizaron tablas de comparación (tablas 11 y 12) a fin de lograr establecer una similitud entre la especie descrita en la literatura y los aislados del presente trabajo. Lo anterior solamente se realizó para aquellos de la clase Actinobacteria pues el género *Bacillus* y *Hallobacillus* son complejos con respecto a sus perfiles metabólicos.

Tabla 11. Tabla comparativa contra la especie *Serinicoccus chungangensis*.

	G2 (KEG-AD-01)	<i>Serinicoccus chungangensis</i>
Colonias	amarillas	amarillas
Galactosa	-	w
Leucina	-	+
Ribosa	-	w
Triptofano	-	w
Valina	+	+

(w), weakly positive (debil)

(+), positivo

(-), negativo

Tabla 12. Tabla comparativa contra la especie *Demequina globuliformis*.

	G4 (KEG-AD-04)	<i>Demequina globuliformis</i>
Adenina	-	+
Arabinosa	+	-
Arginina	+	-
Caseina	-	+
Celobiosa	+	+
Fructosa	+	+
Galactosa	-	+
Lactosa	+	+
Leucina	-	+
Maltosa	-	+
Manitol	-	-
Manosa	+	+
Rhamnosa	+	+
Sucrosa	+	+
Tirosina	-	+
Valina	+	+
Xantina	-	-
Xilosa	+	+

(+), positivo

(-), negativo

De acuerdo a las tablas comparativas, se observa que el aislado KEG-AD-01 y *Serinicoccus chungangensis* podría ser la misma especie pues su única diferencia se encuentra en la utilización de leucina por parte de *S. chungangensis* y nuestro aislado no. Es decir, nuestro aislado seguramente corresponde a *S. chungangensis* aunque hay que destacar que la información en la literatura fue muy pobre a comparación con la información obtenida en este trabajo.

Con respecto al aislado KEG-AD-04 y su comparación en la literatura con *Demequina globuliformis*, en este caso a pesar de la similitud de la secuencia del gen 16S rRNA, podríamos asumir que nuestro aislado corresponde a una nueva especie pues las pruebas realizadas demuestran que KEG-AD-04 es diferente en pruebas tales como degradación de adenina, utilización de arabinosa y de arginina, por citar unas cuantas.

6. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, podemos resaltar las siguientes conclusiones:

- Se aislaron microorganismos de posible interés tanto Firmicutes como de la clase Actinobacteria.
- Se obtuvieron aislados BAL que aunque no eran de interés específico para este proyecto, sugieren un posible rol dentro del tracto digestivo del camarón.
- El representante del grupo 9, seguramente se generó a partir de una contaminación pues no hay reportes de la presencia de *Staphylococcus epidermidis* en tractos digestivos.
- Los microorganismos de la clase Actinobacteria seguramente son componentes del tracto digestivo del camarón pues de acuerdo con la literatura, otras especies de esos géneros han sido recuperadas de ambientes acuáticos.

7. PERSPECTIVAS

- Sería adecuado estudiar nuevamente a los aislados del grupo cuyo representante correspondió a *Staphylococcus epidermidis*.
- Realizar otros aislamientos selectivos, por ejemplo cambiando el antibiótico para observar si se llega a aislar lo mismo o si aparecen nuevos grupos microbianos.
- Establecer el papel de los microorganismos identificados dentro del tracto digestivo del camarón.
- Establecer más pruebas al aislado KEG-AD-02 para determinar el tipo de cepa o si se representa una cepa nueva.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Al-Harbi, A & Uddin, N. 2005. Bacterial Diversity of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Cultured in Brackish water in Saudi Arabia. *Aquaculture*, 250: 566-572.
2. Axellsson, L. 1998. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salmine, S., and Von Wright, A. (ed.) *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y. 617 pp.
3. Ball, A.S., Betts, W.B. & McCarthy, A.J. 1989. Degradation of lignin-related compounds by actinomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, 55:1642-1644.
4. Benson, D.R. & Silvester, W.B. 1993. Biology of *Frankia* Strains, Actinomycete Symbionts of Actinorhizal Plants. *Microbiology Review Journal*, 57: 293–319.
5. Bérdy, J. 1995. Are actinomycetes exhausted as a source of secondary metabolites? *Biotechnology*, 7-8: 13-14.
6. Buford, M., Thompson, P., McIntosh, R., Barman R. & Pearson, D. 2003. Nutrient and Microbial Dynamics in High-Intensity, Zero-Exchange Shrimp Ponds in Belize. *Aquaculture*, 219: 393-411.
7. Cahill, M. M. 1990. Bacterial Flora of Fishes: A Review. *Microbial Ecology*, 19: 21-41.
8. Cedeño, R. 2005. El Uso del DGGE como Herramienta Molecular Para el Estudio y Caracterización Bacteriana. CENAIM: Boletín Informativo No. 128.
9. Cintas, L.M., Casaus, P. & Hernández, P.E. 2000 Bacterias Lácticas de Origen Alimentario: Consideraciones Taxonómicas y Filogenéticos, *Alimentaria*, 38: 61-70.
10. Cruz, S. 1996. Digestión en camarón y su relación con formulación y fabricación de alimentos balanceados. IV enzimas digestivas y estudios sobre digestibilidad para organismos acuáticos. *Avances en Nutrición Acuícola*.
11. Ferrer, M. 2004. Metagenoma: Acceso a los Recursos Potencialmente Ilimitados de Microorganismos no Cultivables. *Actualidad SEM*, 38: 11-17.

12. Fredrickson, A. G. & Stephanopoulos, G. 1981. Microbial Competition. *Science*, 213: 365-378.
13. Fuller, R. 1989. Probiotics in men and animals. *Journal of applied Bacteriology*, 66:365-368.
14. García, R. R. 2003. Relevancia de las bacterias ácido lácticas en los diferentes estadios del cultivo del camarón. Tesis UABCS, La Paz BCS, México.
15. Gatesoupe, F. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180: 147-165.
16. Global Outlook for Aquaculture Advocate Leadership (GOAL). 2008. Qingdao, China.
17. Goodfellow, M. & Haynes, J.A. 1984. Actinomycetes in marine sediments. In: Ortiz-Ortiz L., Bojalil L.F. & Yakoleff V. (eds), *Biological, biochemical and biomedical aspects of actinomycetes*. Academic Press, Orlando, 453-472 pp.
18. Groth, I. & Saiz-Jimenez, C. 1999. Actinomycetes in hypogean environments. *Geomicrobiology Journal*, 16:1-8.
19. Hardin, S.H. 2001. DNA sequencing. *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group, EUA.
20. Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J. & Schillinger, U. 2001. Taxonomy and Important Features of Probiotic Microorganisms in Food and Nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 365S–373S.
21. Holzapfel, W. H. P., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U. & Veld, J. H. J. 1998. Over view of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41: 85-101.
22. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus_vannamei/es

23. Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H. & Salminen, S. 2001. Probiotics: Effects on Immunity. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73 (suppl) 444S-450S.
24. Kim, O., Cho, Y., Lee, K., Yoon, S., Kim, M., Na, H., Park, S., Jeon, Y.S., Lee, J., Yi, H. Won, S. & Chun, J. 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62, 716-721.
25. Kim, Y., Flynn, T.R., Donoff, R.B., Wong, D.T. & Todd, R. 2002. The Gene: The Polymerase Chain Reaction and Its Clinical Application. *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 60:808-815.
26. Klaenhammer, T. R. & Kullen, M. J. 1999. Selection and Design of Probiotic. *International Journal of Food Microbiology*, 50: 45 – 47.
27. Labeda, D.P. 1987. Actinomycete taxonomy: generic characterization. *Developments in Industrial Microbiology. Journal of Industrial Microbiology*, 28:115–121.
28. Lazzarini, A., Cavaletti L., Toppo, G. & Marinelli, F. 2000. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leewenhoek*, 78: 399-405.
29. Lea Mayer, B. R., Walsh, M. A., Brock, J. A. & Fujioka, R. S. 1997. Cold stress-induced changes in the aerobic Heterotrophic Gastrointestinal Tract Bacteria Flora of Red Hybrid Tilapia. *Journal of Fish Biology*, 50: 770-780.
30. Lindgren, S. E. & Dobrogosz, W. J. 1990. Antagonist activities of lactic acid bacteria in food and feet fermentations. *FEMS Microbiology Reviews*, 87:149-164.
31. Locci, R. 1994. Actinomycetes as Plant Pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 100: 179–200.
32. Logan, N.A. 1994. *Bacterial Systematics*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 272 pp.

33. Madigan, M. T. & Martinko, J. M. 2006. Brock Biology of microorganisms. Pearson-Prentice Hall, USA. 11th Ed. 335, 414-415 pp.
34. Maldonado, L.A., Fenical, W., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., Mincer, T. J., Ward, A. C., Bull, A. T. & Goodfellow, M. 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.
35. Maldonado, L.A. 2009. Manual de "Biología Molecular y Bioinformática en Microorganismos Marinos". Proyecto DGAPA-PAPIME PE206207.
36. Metzker, M.L. & Caskey, T.C. 2001. Polymerase Chain Reaction (PCR). Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley y Sons, 1-9 pp.
37. Mincer, T.J., Jensen, P. R., Kauffman, C. A. & Fenical, W. 2002. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. Applied and Environmental Microbiology, 68: 5005-5011.
38. Molina, P. C., Escobar, V., Gamboa, D.J., Cadena, E., Orellana, F. & Piña, R., 2002. Estrategia de alimentación de acuerdo a la demanda fisiológica juvenil *Litopenaeus vannamei*. Avances en Nutrición Acuícola VI.
39. Morales, M. S. 2000. Manual para la detección de enfermedades de camarones peneidos, en el pacifico mexicano. Rev. Panorama acuícola, 54-55 pp.
40. Moriarty, D. 1997. The Role of Microorganisms in Aquaculture Ponds. Aquaculture, 151: 333-349.
41. Moss, S., Divakaran, S. & Kim, G., 2001. Stimulating effects of pond water on digestive enzyme activity in the Pacific White shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). Aquaculture, 32: 125-131.
42. Newton, C.R. & Graham, A. 1997. PCR. 2a edición. Springer-Verlag, New York, EUA. 192 pp.

43. Oldfield, C., Wood, N.T., Gilbert, S.C., Murray, F.D. & Faure, F.R. 1998. Desulphurisation of Benzothiophene and Dibenzothiophene by Actinomycete Organisms Belonging to the Genus *Rhodococcus*, and Related Taxa. *Antonie van Leeuwenhoek*, 74: 119–132.
44. Pal, D. & Gupta, C. D. 1992. Microbial Pollution in Water and its Effect on Fish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 4: 32-39.
45. Peczyńska-Czoch, W. & Mordarski, M. 1988. Actinomycete enzymes. In *Actinomycetes in Biotechnology*. London: Academic Press, 219–283 pp.
46. Prescott, M.L., Harley, P.J. & Klein, A.D. 1999. *Microbiología*. Mc Graw Hill Interamericana.
47. Ringo, E. & Strom, E. 1994. Microflora of Artic Charr, *Salvelinus alpinus*: Gastrointestinal Microflora of Free Living Fish and Effect of Diet and Salinity on Intestinal Microflora. *Aquaculture and Fisheries Management*, 25: 623-629.
48. Ringo, E., Bendisken, H.R., Gausen, S.J., Sundsfjord, A. & Olsen, R.E. 1998. The effect of dietary fatty acids on Lactic Acid Bacteria Associated with the Epithelial Mucosa and from Faecalia of Atlantic Charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Journal of Applied Microbiology*, 85: 855-864.
49. Robertson, P. A. W., Calderon, J., Carrera, L., Stark, J. R., Zherdmant, M. & Austin, B. 1998. Experimental *Vibrio harveyi* Infections in *Penaeus vannamei* Larvae. *Disease of Aquatic Organisms*, 32: 151–155.
50. Rondon, M., Goodman, M. & Handelsman, J. 1999. The Earth's Bounty: Assessing and Accessing the Soil Microbial Diversity. *Trends in Biotechnology*, 17: 403-409.
51. Saiz-Jiménez, C. 1997. Biodeterioration vs biodegradation: the role of microorganisms in the removal of pollutants deposited on historic buildings. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 40:225-232.
52. Sanz, J.L. & Köchling, T. 2007. Molecular Biology Techniques Used in Wastewater Treatment: an Overview. *Process Biochemistry*, 42: 119-133.

53. Schäfer, H. & Muyzer, G. 2001. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis in Marine Microbial Ecology. *Methods in Microbiology*, 30: 425-468.
54. Shirling, E.B. & Gottlieb, D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 16:313-340.
55. Siderman, C. J. 1984 Diseases in marine aquaculture. *Helgolaender Meeresuntersuchungen*, 30:505-532.
56. Simoes, N., Jones, D., Soto – Rodríguez, S., Roque, A. & Gómez – Gil, B. 2002. Las Bacterias en el Inicio de la Alimentación Exógena en Larvas de Camarones Peneidos: Efectos de la Calidad del Agua, Tasas de Ingestión y Rutas de Colonización del Tracto Digestivo. In: Cruz – Suarez., L., Ricque – Marie, D., Tapia – Salazar, M., Gaxiola – Cortés, M., Simoes, N. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VI*.
57. Sneath, P.H.A. 1957. Some thoughts on bacterial classification. *Journal of General Microbiology*, 17:184-200.
58. Stiles, M.E. 1996. Biopreservation by Lactic Bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70: 331-345.
59. Straub, D.V. & Dixon, B.A. 1993. Bacteriological Flora of the Brine Shrimp (*Anemia frunciscana*) from a Hypersaline Pond in San Francisco Bay, California. *Aquaculture*, 118: 309-313.
60. Strohl, W.R. 2004. Antimicrobials. In *Microbial Diversity and Bioprospecting*. American Society for Microbiology Press, Washington USA. 336-355 pp.
61. Strom, E. & Olfasen, J. A. 1990. The Indigenous Flora of Wild-Captured Juvenile Cod in Net-Pen Rearing. 181-185. In: Lésel, R. (Ed.). *Microbiology in poeciloterms*. Elsevier, Amsterdam. 282.
62. Suzuki, K., Kodama, Y. & Mitsuoka, T. 1989. Stress and Intestinal Flora: a Review. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 8: 23-28.
63. Tao, L., Yao, H. & Cheng, Q. 2007. Genes from a *Dietzia* sp. for synthesis of C(40) and C(50) beta-cyclic carotenoids. *Gene*, 386: 90-97.

64. Torsvik, V. & Ovreás, L. 2002. Microbial Diversity and Function in Soil: from Genes to Ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5: 240-245.
65. Torsvik, V., Ovreás, L. & Thingstad T. F. 2002. Prokaryotic Diversity-Magnitude, Dynamics, and Controlling Factors. *Science*, 296: 1064-1066.
66. Traiwan, J., Park, M. & Kim, W., 2011. *Serinicoccus chungangensis* sp. nov., isolated from tidal flat sediment, and emended description of the genus *Serinicoccus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61: 1299-1303.
67. Ue, H., Matsuo, Y., Kasai, H. & Yokota, A., 2011. *Demequina globuliformis* sp. nov., *Demequina oxidasica* sp. nov., and *Demequina aurantiaca* sp. nov., actinobacteria isolated from marine environments, and proposal *Demequinaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61: 1322-1329.
68. Umezawa, H. 1988. Low Molecular Weight Enzyme Inhibitors and Immunomodifiers. In *Actinomycetes in Biotechnology*. Academic Press, 285–325 pp.
69. Wang, Y.B., Xu, Z.R. & Xia, M.S., 2005. The Effectiveness of Commercial Probiotics in Northern White Shrimp (*Penaeus vannamei* L.) Ponds. *Fisheries Science*, 71: 1034–1039.
70. Wang, Y. 2007. Effect of Probiotics on Growth Performance and Digestive Enzyme Activity of the Shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 269: 259-264.
71. Warsheid, T. & Braams, J. 2000. Biodeterioration of stone: a review. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 46:343-368.
72. Watts, J. E., Huddleston, A. S. & Wellington, E. M. 1999. Bioprospecting. In: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Demain, A. L., & J. E. Davies (eds). ASM Press. Washington, D.C. USA. pp: 631- 641.
73. Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M. M. & Bhole, B. D. 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of Microbiology*, 176: 386-390.

74. White, B.A. 2005. Polymerase Chain Reaction (PCR): Design and Optimization of Reactions. Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons. 4 pp.
75. Woese, C. R. 1987. Bacterial Evolution. Microbiological Reviews, 51: 221-7.
76. Zanardini, E., Abbrusciano, P., Ghedini, N., Realini, M. & Sorlini, C. 2000. Influence of atmospheric pollutants on the biodeterioration of Stone. International Biodeterioration and Biodegradation, 45:35-42.
77. Zheng, Z.H., Zeng, W., Huang, Y.J., Yang, Z.Y., Li, J., Cai, H.R., & Su, W.J. 2000. Detection of Antitumor and Antimicrobial Activities in Marine Organism Associated Actinomycetes Isolated from the Taiwan Strait, China. *FEMS Microbiol Lett*, 188: 87–91.

9. ANEXO

9.1. Medios de Cultivo

Todos los medios de cultivo empleados en el presente trabajo, fueron esterilizados a 15 lb, 121 °C por 15 minutos.

GYEA (Agar Glucosa extracto de Levadura; Gordon y Mihm, 1962)	
Glucosa	10 g
Extracto de Levadura	10 g
Agar	12 g
Agua destilada	1000 mL
pH 7.2	

GYEA Marino (Agar Glucosa extracto de Levadura; Gordon y Mihm, 1962)	
Glucosa	10 g
Extracto de Levadura	10 g
Agar	12 g
Agua marina	1000 mL
pH 7.2	

MEDIO BASAL (Fuentes de Nitrógeno) (Shirling y Gottlieb, 1966)	
D-glucosa	10 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	5 g
NaCl	0.5 g
FeSO ₄ •H ₂ O	0.01 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
Agar	18 g
Agua destilada	1000 mL
pH 7.4	

ISP-9 (Fuentes de Carbono) (Shirling y Gottlieb, 1966)	
(NH ₄)SO ₄	2.64 g
KH ₂ PO ₄	2.38 g
K ₂ HPO ₄ •3H ₂ O	5.65 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	1.0 g
Solución sales traza (Pridham y Gottlieb)	1 mL
Agar	18 g
Agua destilada	1000 mL
pH 6.8-7.0	

9.2 Soluciones y Búffers de trabajo

GTE (100mL; Micklos y Freyer, 1990)	
Glucosa al 40% (m/v)	2.27 mL
EDTA 0.5M pH 8	2.0mL
Tris-HCl pH 8	2.5 mL
H ₂ O	93.23 mL

Búffer TBE 10X (Micklos y Freyer, 1990)	
Tris base	11.6g
Ácido bórico	8.42 g
EDTA sódico	0.98g
H ₂ O	1000mL

9.3 Secuencias y resultados de la opción BLAST para cada uno de los aislados

9.3.1 Secuencia KEG-AD-01 (1499 pares)

```
TGCTTACACATGCAAGTCCAACGATGAAGCGGTGCTTGCACCGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAAC
ACGTGAGTAACCTGCCTTCCACTCTGGGATAAGCGCTGGAAACGGCGTCTAATACTGGATATGACATTGCC
CTGCATGGGGTGGTGTGGAAAAGATTTAGTTCGGTGGTAGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGG
GGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGA
CGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCCTTGACGAAGCCCTTGGGGTGACG
GTAGGGGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGT
CCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTTGTAGGCGGCTTGTGCGCTGCTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACC
CGGGTCTGCAGTGGGTACGGGCAGGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGG
AATGCGCATATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCACTACTGACGCTGAGAAGC
GAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGCGCTAGGTGTG
GGTCCCATTCCACGGGGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG
GCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTTCGATGCAACCGG
AAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGACGACTGCAGAGATGTGGTTTCCCTTGTGGCTGGTGTAC
AGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTC
GTTCCATGTTGCCAGCAACACCTTTTGGGTGGTTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGG
AAGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTACGTCTTGGGCTTACGCATGCTACAATGGCCGGTAC
AAAGGGCTGCGATCCCGTGAGGGGGAGCGAATCCAGAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAA
CTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC
TTGTACACACCGCCGTCAGTACGAAAGTCGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCTTGTGGACGG
AGCTGTGCAAGGTGGGACTGGTGATTGGGACTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTG
GGATCACCTCCAT
```

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Serinicoccus chungangensis strain CAU 9536 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2658	2658	99%	0.0	99%	HM068886.1
<input type="checkbox"/>	Serinicoccus sp. JL1109 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2591	2591	97%	0.0	99%	DQ985074.1
<input type="checkbox"/>	Serinicoccus sp. S38 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2569	2569	95%	0.0	99%	JX007966.1
<input type="checkbox"/>	Serinicoccus sp. JSP1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2564	2564	94%	0.0	99%	GU595194.1
<input type="checkbox"/>	Serinicoccus sp. 0714S6-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2538	2538	97%	0.0	98%	EU603762.1

9.3.2. Secuencia KEG-AD-02 (1509 pares)

```

GCGGCGTGCCTATACATGCAGTCGAGCGCGGGAAGCGAGTGGATCCCTTCGGGGTGAAGCTCGTGGAAACG
AGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGATCGGAATAACCCCGGGAAACCGGGG
CTAATGCCGGTAATACTTTCTTTTCGCATGAAGGAAAGTTGAAAGATGGCTTCTCGCTATCACTTACAGATG
GGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGA
GGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC
GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAACGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGTTCTGTT
GTTAGGGAAGAACAAGTACCGTGCGAATAGAGCGGTACCTTGACGGTACCTAACGAGGAAGCCCCGGCTA
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCG
CGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGA
ACTTGAGGACAGAAGAGGAGAGTGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACA
CCAGTGCCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTTTCTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGAT
TACATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGGCTTCCACCCCTTAGTGCTG
AAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGAGTACGGCCGAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG
GCCCCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCCAAGCAACGAAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCC
TTGGACAATCCTAGAGATAGGACTTTCCTTCGGGGACCAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCT
CGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTAATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGG
GCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTA
TGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGTGTAGCAAATCC
CATAAAACCATTCTCAGTTCCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGC
GGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTGGCA
ACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCCGCAAGGTGGGGCCAATGATTGGGGTGAAG
TCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGGAATCACCTTC

```

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/> Halobacillus trueperi strain HLSB3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2756	2756	99%	0.0	99%	FJ999554.1
<input type="checkbox"/> Halobacillus trueperi strain LS5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2756	2756	99%	0.0	99%	FJ937876.1
<input type="checkbox"/> Halobacillus trueperi strain GSP38 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2741	2741	98%	0.0	99%	AY505522.1
<input type="checkbox"/> Halobacillus trueperi strain DSM 10404 16S ribosomal RNA, complete sequence >emb AJ310149.1 Halobacillus trueperi 16S rRNA gene, strain DSM 10404	2741	2741	99%	0.0	99%	NR_025459.1
<input type="checkbox"/> Halobacillus trueperi strain GSP062 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2726	2726	98%	0.0	99%	DQ157162.1

9.3.3. Secuencia KEG-AD-04 (1637 pares)

```

CTGGCGCGTGCTTACACATGCAAGTCCAACGGTGAAGCGAGAGCTTGCTCTTGTGGATCAGTGGCGAAC
GGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCCAGACTCTGGGATAAGCCTTGAAACGAGGTCTAATACCGGA
TAAGCGGCACCACCGCATGGTGTAGTGTGGAAAGATTTTTTGGTCTGGGATGGACTCGCGGCCTATCAGC
TTGTTGGTGTAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTG
GAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTG
ATGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCCCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAA
GTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAG
CGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGTCTGCTGTGAAATCCCGAGGCT
CAACCTCGGGCTTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGTGGTAGGGGAGACTGGAATCCTGGTGTAGC
GGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCACAACCTGACGCTGA
GGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGGTGGGCACTAG
ATGTGGGGACTATTCCATGGTTTCCGCGTCGCAACTAACGCATTAAGTGCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGC
AAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAA
CGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACGGTCTATCCCTAGAGATAGGGAGTGATTTTTTCGCCGTAT
ACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
TCGTCCTATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCATAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGT
GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTTACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGG
GCTGCGATACCGTAAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGAGGTCTGCAACTCGAC
CTCATGAAGTTGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
ACACCGCCCGTCAAGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGTGCGCCTAACTCTTGTAGAGGGAGACGT
CTAAGGTGGGATTGGCGATTGGGACTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCAC
CCTCCATTAGACGTCTCCCTCTCAAAGAGTTAGGCCGACGGCTTCGGGGTGTACCGACTTTCGTGACTTGA
CGGGGGGTGTGTCAGGGCCGGAACGTTTTTAACGGAGAGTTGGTGTGCGCGAATAATAGCGACTCCCCG
TTTATG

```

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/> Demequina globuliformis gene for 16S rRNA, partial sequence	2604	2748	98%	0.0	99%	AB639018.1
<input type="checkbox"/> Sanquibacter sp. NH20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2573	2733	98%	0.0	98%	EU109730.1
<input type="checkbox"/> Demequina sedimicola gene for 16S rRNA, partial sequence	2556	2700	98%	0.0	98%	AB674957.1
<input type="checkbox"/> Demequina globuliformis gene for 16S rRNA, partial sequence	2553	2696	97%	0.0	99%	AB522643.1
<input type="checkbox"/> Demequina salsinensis gene for 16S rRNA, partial sequence	2519	2668	98%	0.0	98%	AB639017.1

9.3.4 Secuencia KEG-AF-01 (1466 pares)

```

GCGGGAAGCGGGTGGATCCCTTCGGGGTGAAGCTCGTGGAACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG
GGCAACCTGCCTGTAAGATCGGAATAACCCCGGAAACCGGGGCTAATGCCGGGTAATACTTTCTTTTCGCA
TGAAGGAAAGTTGAAAGATGGCTTCTCGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTG
AGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTACCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAA
CGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTGCGAAT
AGAGCGGTACCTTGACGGTACCTAACGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGA
AAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAACTGGGGAACTTGAGGACAGAAGAGGAGAGTGGAA
TTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTATATATGTGGAGGAACACCCGTGGGCGAAGGCCACTCTCTGGTCTG
TTTCTGACGCTGAGGTGCCAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCCCGCCGTAAC
GATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGGCTTCCCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCGGGG
GAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGCGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
AATTCAAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTGACAATCCTAGAGATAGGACTTCCCT
TCGGGGACCAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC
AACGAGCGCAACCCCTAATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAC
CGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG
ATGGTACAAAGGCGAGCGAAGCCGCGAGGTGTAGCAAATCCCATAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGCAG
GCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC
CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTGGCAACACCCGAAGTGGTGGAGGTAACCTTTTT
GGAGCCAGCCCGCAAGGTGGGGCCAATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGT
GCGGCTGGAATCACCTCCAT

```



Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/> Halobacillus trueperi strain HLSB3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2675	2675	99%	0.0	99%	FJ999554.1
<input type="checkbox"/> Halobacillus trueperi strain LS5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2675	2675	99%	0.0	99%	FJ937876.1
<input type="checkbox"/> Halobacillus trueperi strain GSP38 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2651	2651	98%	0.0	99%	AY505522.1
<input type="checkbox"/> Halobacillus trueperi strain DSM 10404 16S ribosomal RNA, complete sequence >emb AJ310149.1 Halobacillus trueperi 16S rRNA gene, strain DSM 10404	2651	2651	99%	0.0	99%	NR_025459.1
<input type="checkbox"/> Halobacillus trueperi strain GSP062 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2636	2636	98%	0.0	99%	DQ157162.1

9.3.5 Secuencia KEG-AH-01 (1495 pares)

```

GGCGGTAGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACAGACGAGGAGCTTGCTCCTCTGACGTTAGCGGCGG
ACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCG
GATAATATATTGAACCGCATGGTTCAATAGTAAAGACGGTTTTTCTGCTCACTTATAGATGGATCCGCGCCC
CATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC
CACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGGCGA
AAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTATTAGGGAAGA
ACAAATGTGTAAGTAACTATGCACGTCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTTT
TAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAAACCTTGAGTGCAAAA
GAAGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCATAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGC
GACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTA
GCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGT
GGAGCATGTGGTTTAATTCCAAGCAACGCAACAACCTTACCAAATCTTGACATCCTCTGACCCCTCTAGAG
ATAGAGTTTTCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCTGAGATG
TTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGTTGA
CTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACAC
ACGTGCTACAATGGACAATACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTCAAGCAAATCCCATAAAGTTGTTCTCA
GTTCCGATTGTAGTCTGCAACTCGACTATATGAAGCTGGAATCGTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTACG
GTGAATACGTTCCCGGGTCTTGACACACCCGCCGTACACCACGAGAGTTTGAACACCCGAAGCCGGTG
GAGTAACCATTTGGAGCTAGCCGTGCAAGGTGGGACAAATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCG
TATCGGAAGGTGCGGCTGGGATCACCTCCAT
    
```

Alignments  GenBank Graphics Distance tree of results 							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Staphylococcus sp. H780 gene for 16S ribosomal RNA, isolate: H780	2748	2748	99%	0.0	99%	AB177644.1
<input type="checkbox"/>	Staphylococcus epidermidis RP62A, complete genome	2748	16443	99%	0.0	99%	CP000029.1
<input type="checkbox"/>	Staphylococcus epidermidis RP62A strain RP62A.16S ribosomal RNA, complete sequence	2743	2743	99%	0.0	99%	NR_074995.1
<input type="checkbox"/>	Staphylococcus epidermidis strain JDM2_4A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2743	2743	99%	0.0	99%	JN644522.1
<input type="checkbox"/>	Staphylococcus epidermidis strain SR1 clone step.1051c07 genomic sequence	2743	2743	99%	0.0	99%	AF270147.1

9.3.6 Secuencia KEG-AG-02 (1668 pares)

```
TGGCGGCGTGCTTAACCATGCAGTCGAACGGTGAAGCGAGAGCTTGCTCTTGTGGATCAGTGGCCGAACGG
GTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCCAGACTCTGGGATAAGCCTTGAAACGAGGTCTAATACCGGATAA
GCGGCACCACCGCATGGTGAGTGTTGGGAAAGATTTTTTGGTCTGGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTG
TTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGA
ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGAT
GCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAACCCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGT
GACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCG
TTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGTCTGCTGTGAAATCCCGAGGCTCA
ACCTCGGGCTTGCACTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGTGGTAGGGGAGACTGGAATCCTGGTGTAGCGG
TGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCACAACACTGACGCTGAGG
AGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGGTGGGCACTAGAT
GTGGGGACTATTCCATGGCTTCCGCGTCGCACCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGGAGTACGGCCGC
AAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCCAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTTCCATGCA
ACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACGGTCTATCCCTAGAGATAGGGAGTGATTTTTTCGCCGTA
TACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACC
CTCGTCCTATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCATAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGG
TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAG
GGCTGCGATACCGTAAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGAGGTCTGCAACTCG
ACCTCATGAAGTTGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT
ACACACCGCCGTC AAGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGTGCGCCTAACTCTTTGAGAGGGGAGAC
GTCTAAGGTGGGATTGGCGATTGGGACTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATC
ACCCTCCTTAGACGTCTCCCTCTCAAGAGTTAGGCCGACGGCTTCGGGTGTTACCGACTTTCGTGACTTGAC
GGGCGGTGTGTTACAGCCCCGGAACGTTTTCCCGCAGCGTTGCTGATCCGCGATTACAGAGACTCCAAC
TAATGAGGTAGAGTAGCGGACACCATCCGAGCGGGGACGTTTTCTTGGGTTTCGCCCCCTT
```

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results






Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/> Demequina globuliformis gene for 16S rRNA, partial sequence	2577	2799	98%	0.0	98%	AB639018.1
<input type="checkbox"/> Sanquibacter sp. NH20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2551	2790	98%	0.0	98%	EU109730.1
<input type="checkbox"/> Demequina sedimicola gene for 16S rRNA, partial sequence	2529	2751	98%	0.0	98%	AB674957.1
<input type="checkbox"/> Demequina globuliformis gene for 16S rRNA, partial sequence	2525	2748	97%	0.0	98%	AB522643.1
<input type="checkbox"/> Actinobacterium A11 gene for 16S rRNA, partial sequence	2503	2742	96%	0.0	98%	AB302329.1

9.3.7 Secuencia KEG-AK-01 (1496 pares)

```

GGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAAGAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATCTTAGCGGCGGACG
GGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCCTGCAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGGT
AATACATCGCACCGCATGGTGCAATGTTGAAAGTTGGCCTTTGGATATCACTGCGGGATGGGCCCCGCGGCC
CATTATCTATTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACAATGCGTATCCCACCTGAGAGGGTGATCGGCC
ACACTGGGACTGAGACACGGCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCCAATGGACAAA
AGTCTGACAGAGCAACGCCGCGTGAGTGACAAAAGCCTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAA
CAAGTACCGTTGCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC
AGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTT
TTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCACCCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGAGGACTTGAGTGCAAA
AAAGGAGAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTATATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGG
GGCTCTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACGCCGCAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGGGGTTCCACCCTCACTGCTGAAGTTAACACATTACA
CACTCCGCCGGGGAGTACGACCGCAAGTTGAAACTCAAAGAATTGAGCGGGGGCCCGACAAGCAGTG
GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTGGAG
ACAGGACGTTCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAAGT
GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTG
ACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTAC
ACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCAACACCGCGAGGTGAAGCAAATCCCATAAAGCCGTTT
TCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCC
GCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTGC
GTGGGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCCGCAAGGTGGGACAAATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA
GCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGGATCACCTC

```

Alignments  Download  GenBank  Graphics  Distance tree of results 						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/> Bacillus baekryungensis strain LS218 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2628	2628	100%	0.0	98%	FJ937928.1
<input type="checkbox"/> Bacillus baekryungensis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2593	2593	99%	0.0	98%	AF541965.1
<input type="checkbox"/> Bacillus baekryungensis strain GSP56 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2580	2580	98%	0.0	98%	AY505508.1
<input type="checkbox"/> Bacillus baekryungensis strain GSP54 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2580	2580	98%	0.0	98%	AY505507.1
<input type="checkbox"/> Bacillus baekryungensis strain GSP51 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2580	2580	98%	0.0	98%	AY505505.1

9.4 Tablas de resultados de Pruebas Fenotípicas

Tabla 13. Crecimiento de aislados en pruebas de Degradación de Sustratos.

	G2 (KEG-AD-01)			G4 (KEG-AD-04)			G8 (KEG-AF-01)			G9 (KEG-AH-01)			G12 (KEG-AK-01)		
	7 días	14 días	21 días	7 días	14 días	21 días	7 días	14 días	21 días	7 días	14 días	21 días	7 días	14 días	21 días
Adenina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Caseína	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipoxantina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tirosina	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		XX	XXXX												
Xantina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 14. Crecimiento de aislados en Fuentes de Nitrógeno.

	G2 (KEG-AD-01)			G4 (KEG-AD-04)			G8 (KEG-AF-01)			G9 (KEG-AH-01)			G12 (KEG-AK-01)		
	7 días	14 días	21 días	7 días	14 días	21 días	7 días	14 días	21 días	7 días	14 días	21 días	7 días	14 días	21 días
Ac. Aspartico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ac. Glutamico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adenina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alanina	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+
	X	X	XX							XXXX	XXXX	XXXXX			XX
Arginina	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	X	XX	XXX			XX	X	XX	XXX	XX	XXXX	XXXXX		XXX	XXXX
Fenilalanina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Histidina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isoleucina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
											X	XX			
Leucina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metionina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
												XXX			
Norleucina	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
			XX									XX			XX
Omitina	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
	XX	XX	XX							XXX	XXX	XXXX			
Prolina	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	XX	XX	XXX							XXX	XXXX	XXXX	XXX	XXXXX	XXXXX
Serina	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	X	XX	XX							XXX	XXXXX	XXXXX	XXX	XXXXX	XXXXX
Triptofano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Valina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	X	XX	XX	X	X	XX	X	X	XX	X	XX	XXX	X	XXX	XXX

Tabla 15. Crecimiento de aislados en Fuentes de Carbono.

	G2 (KEG-AD-01)			G4 (KEG-AD-04)			G8 (KEG-AF-01)			G9 (KEG-AH-01)			G12 (KEG-AK-01)		
	7 días	14 días	21 días	7 días	14 días	21 días	7 días	14 días	21 días	7 días	14 días	21 días	7 días	14 días	21 días
Ac. Benzoico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ac. Malónico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ac. Mucico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ac. Pirúvico	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	xx	xxx	xxxx							xxx	xxxx	xxxxx	xxxx	xxxx	xxxxx
Ac. Oxálico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinosa	+	+	cont	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	x	xxx		xx	xxx	xxxx	xx	xx	xxx	xxx	xxxx	xxxxx	xxx	xxxxx	xxxxx
Celobiosa	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	x	xx	xx	xx	xxx	xxxx				xxx	xxxxx	xxxxx	xx	xxxxx	xxxxx
Dextrano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dextrosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	xx	xxx	xxxx	xx	xxxx	xxxx	xxx	xxxx	xxxx	xxxx	xxxx	xxxxx	xxxx	xxxxx	xxxxx
Dulcitol	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		xx	xx												
Fructosa	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
					x	xx				xxxx	xxxx	xxxxx	xxx	xxxx	xxxx
Galactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
		x	xx			xx			xx		xx	xxxx		xx	xxx
Lactosa	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+
		x	xxx			xxxx		xx	xxxx		xxxx	xxxxx			xx
Maltosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
										x	xxx	xxxxx	x	xxxx	xxxxx
Manosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	xx	xxx	xxxx	xx	xxx	xxxx	x	xxx	xxxx	xxxx	xxxxx	xxxxx	xxxx	xxxxx	xxxxx
Melobioza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melozitosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pectina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	x	xx	xxx	x	xxxx	xxxx	x	xx	xxx	xxx	xxxxx	xxxxx	xxx	xxxxx	xxxxx
Rafinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnosa	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+
				xx	xxxx	xxxx				xxx	xxxx	xxxx		xxxxx	xxxxx
Ribosa	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
				x	xx	xxx				xxx	xxxx	xxxx	xx	xxxx	xxxxx
Sorbitol	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	xx	xx	xxx							xxxx	xxxx	xxxxx	xxxx	xxxxx	xxxxx
Sorbosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrosa	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	xxx	xxx	xxx	xxx	xxxx	xxxxx		xx	xxx	xxxx	xxxxx	xxxxx	xxxx	xxxx	xxxxx
Trehalosa	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
		xx	xxx	xxx	xxxxx	xxxxx				xxxx	xxxxx	xxxxx	xxxx	xxxxx	xxxxx
Xilitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilosa	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	x	xx	xx	x	xxx	xxx				xxxx	xxxx	xxxx	xxx	xxxx	xxxxx