

Evaluation of the Gulf of California as a potential source of bioactive marine actinobacteria

Evaluación del golfo de California como una fuente potencial de actinobacterias marinas bioactivas

M Torres-Beltrán¹, F Cardoso-Martínez¹, N Millán-Aguiñaga², A Becerril-Espinosa¹, IE Soria-Mercado^{1*}

¹ Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada 22820, Baja California, México.

² Scripps Institution of Oceanography, University of California San Diego, La Jolla, CA 92093-0204, USA.

* Corresponding author. E-mail: iesoria@uabc.edu.mx

ABSTRACT. Actinobacteria produce many bioactive compounds currently used as antibiotics and anticancer drugs. The objective of this project was to evaluate the Gulf of California as a novel source of bioactive actinobacterial strains. A total of 235 actinobacterial strains were isolated from marine sediment collected in Concepción and los Ángeles bays (Mexico). Based on their morphology, seawater requirements, and 16S rRNA sequencing, actinobacterial strains were classified as *Streptomyces*, *Micromonospora*, and *Salinispora*. Sixty-nine organic and aqueous extracts were obtained using liquid-liquid extraction with ethyl acetate; 17 showed cytotoxic activity against breast cancer cells (MCF7) and cervical cancer cells (HeLa). The highest activity values observed, expressed as survival percentage, were 20–25% against MCF7 cells (strains S-365, S-355, and S-361) and 24–25% against HeLa cells (strains S-165, S-361, and S-353). Only three aqueous extracts showed antibiotic activity towards methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, with activity values of 3% and 6% for strains S-370 and S-369, respectively. Molecular weights found by liquid chromatography-mass spectrometry analysis are reported for *Micromonospora* species isolated from soil, but no species-specific secondary metabolite evidence was observed for *Salinispora* isolates. The biological activity observed in this work offers opportunities for further chemical studies to define the compounds responsible for this activity in order to contribute to the discovery of new drugs and to acknowledge the Gulf of California as a reservoir of marine bioactive actinobacteria strains that are important for human health.

Key words: marine actinobacteria, *Salinispora*, cytotoxic, antibiotic, Gulf of California.

RESUMEN. Las actinobacterias son productoras de una gran variedad de compuestos utilizados actualmente como antibióticos y anticancerígenos. En este trabajo se evaluó el potencial del golfo de California como fuente de cepas de actinobacterias bioactivas. En total, se aislaron 235 cepas de actinobacterias de los sedimentos de bahía Concepción y bahía de los Ángeles, (México). Con base en su morfología, requerimiento de agua de mar para su crecimiento y secuenciación del gen 16S del ARNr, las cepas se clasificaron como *Streptomyces*, *Micromonospora* y *Salinispora*. Mediante la técnica de extracción líquido-líquido con acetato de etilo como disolvente, se obtuvieron 69 extractos orgánicos y acuosos; 17 mostraron actividad citotóxica contra las líneas celulares de cáncer de mama (MCF7) y cérvix (HeLa). Los valores máximos de actividad, expresados como porcentaje de supervivencia, fueron de 20–25% contra MCF7 (cepas S-365, S-355 y S-361) y de 24–25% contra HeLa (cepas S-165, S-361 y S-353). Tres extractos en su fracción acuosa mostraron actividad antibiótica contra *Staphylococcus aureus*, que es resistente a la meticilina, con valores de actividad de 3% y 6% (cepas S-370 y S-369, respectivamente). Con base en el análisis de cromatografía líquida con detector de masas, se encontraron pesos moleculares de compuestos previamente documentados para especies terrestres del género *Micromonospora*; sin embargo, no se identificaron los pesos moleculares de metabolitos específicos previamente documentados para las cepas del género *Salinispora*. La bioactividad observada en este trabajo ofrece la oportunidad de un estudio químico posterior para definir los metabolitos responsables de la actividad a fin de contribuir con el descubrimiento de nuevos fármacos y ubicar al golfo de California como una fuente potencial de cepas de actinobacterias productoras de compuestos bioactivos de importancia para la salud humana.

Palabras clave: actinobacterias marinas, *Salinispora*, citotóxico, antibiótico, golfo de California.

INTRODUCTION

Marine sediment is capable of maintaining a numerous population of microorganisms (Ward and Bora 2006); therefore, it is a highly competitive environment where bacteria require the development of strategies in order to obtain

INTRODUCCIÓN

El sedimento marino tiene la capacidad de mantener una numerosa población de microorganismos (Ward y Bora 2006), por lo que es considerado como un ambiente altamente competitivo en donde las bacterias requieren del

nutrients (Vernam and Evans 2000, Challis and Hopwood 2003). The production of specific antagonist substances is a competitive strategy that may inhibit or regulate the growth of certain microorganisms in the population (Vernam and Evans 2000). The capability of certain types of microorganisms to produce this kind of secondary metabolites offers an efficient response to different stress factors and a survival advantage that other microorganisms do not have (Maier *et al.* 2000, Surajit-Das *et al.* 2006).

Actinobacteria are Gram-positive, filamentous bacteria belonging to the order Actinomycetales, characterized for producing bioactive compounds (Fenical and Jensen 2006). They are a very successful, broadly distributed group and have several characteristics that favor them when competing with other saprophytic microorganisms. Actinobacteria produce different types of spores that function as dispersion and survival agents, and most of them are capable of forming a radial mycelium that helps to colonize substrates far from the growth center (Maier *et al.* 2000, Prieto-Davó *et al.* 2008).

Secondary metabolites produced by marine bacteria have proved to be highly efficient against pathogen agents that affect the health of human beings (Davies 2006, Surajit-Das *et al.* 2006). Two-thirds of the antibiotics used nowadays are fermentative products obtained from actinobacteria, such as streptomycin, tetracycline, chloramphenicol, and erythromycin, all of them compounds isolated from different terrestrial species of the genus *Streptomyces* (Challis and Hopwood 2003, Magarvey *et al.* 2004, Fenical and Jensen 2006).

Marine sediment has recently become a novel and potential source for new bioactive actinobacterial isolates (Mincer *et al.* 2002, Bull *et al.* 2005, Maldonado *et al.* 2005b), and marine actinobacteria have become a novel source of new metabolites that possess a significant biotechnological and pharmaceutical importance. Some of these new secondary metabolites are antitumor and immunosuppressive compounds (Mincer *et al.* 2002). These include the anticancer salinosporamide A isolated from *Salinispora tropica*, which is in clinical phase II for cancer treatment (Maldonado *et al.* 2005a, Fenical *et al.* 2009); the antitumor antibiotics marinomycins A to D isolated from *Marinophilus* strains; and the antibiotic abyssomycin C isolated from *Verrucosipora* strains (Fenical and Jensen 2006, Kwon *et al.* 2006).

Two families are recognized for the great amount of secondary metabolites they produce: Streptomycetaceae and Micromonosporaceae (Magarvey *et al.* 2004, Fenical and Jensen 2006). *Salinispora* was the first marine actinobacterial genus found and it belongs to the family Micromonosporaceae (Mincer *et al.* 2002, Maldonado *et al.* 2005a). Two species of this genus have been described: *Salinispora arenicola* and *S. tropica* (Maldonado *et al.* 2005a, Fenical and Jensen 2006, Jensen 2010). A third species, *S. pacifica*, has been proposed by Jensen and Mafnas (2006). More than 100 *Salinispora* spp. isolates have been cultured, and more than 80% have shown antitumor activity and 35% antibiotic activity (Fenical and Jensen 2006).

desarrollo de estrategias que les permitan acceder a los nutrientes de su medio (Vernam y Evans 2000, Challis y Hopwood 2003). La producción de sustancias antagonistas específicas es una estrategia competitiva que puede inhibir o regular el crecimiento de ciertos microorganismos en una población (Vernam y Evans 2000). La capacidad de algunos microorganismos para producir este tipo de metabolitos secundarios les ofrece una respuesta más eficiente a diferentes factores de estrés y una ventaja de supervivencia con respecto a aquellos que no los producen (Maier *et al.* 2000, Surajit-Das *et al.* 2006).

Las actinobacterias son bacterias Gram-positivas filamentosas que pertenecen al orden *Actinomycetales* y se caracterizan por la producción de compuestos con actividad biológica (Fenical y Jensen 2006). Las actinobacterias son un grupo ampliamente distribuido y con diversas características que les permiten competir exitosamente con otros microorganismos saprofitos. Se caracterizan por la producción de diferentes tipos de esporas que les sirven como agentes de dispersión y supervivencia, y la mayoría tiene la capacidad de formar un micelio radial que le permite la colonización de substratos lejos de su centro de crecimiento (Maier *et al.* 2000, Prieto-Davó *et al.* 2008).

Los metabolitos secundarios producidos por bacterias marinas han demostrado ser altamente eficientes contra agentes patógenos que afectan a la salud humana (Davies 2006, Surajit-Das *et al.* 2006). Dos tercios de los antibióticos actualmente utilizados son los productos fermentativos de actinobacterias, como la estreptomina, la tetraciclina, el cloramfenicol y la eritromicina, que son obtenidos a partir de diferentes especies terrestres del género *Streptomyces* (Challis y Hopwood 2003, Magarvey *et al.* 2004, Fenical y Jensen 2006).

Recientemente el sedimento marino se ha convertido en un nuevo y prometedor reservorio de nuevas cepas de actinobacterias bioactivas (Mincer *et al.* 2002, Bull *et al.* 2005, Maldonado *et al.* 2005b). Las actinobacterias marinas son actualmente reconocidas como una fuente de metabolitos nuevos con gran importancia biotecnológica y farmacéutica. Algunos de estos nuevos metabolitos son compuestos con actividad antitumoral e inmuno-supresora (Mincer *et al.* 2002). Estos compuestos incluyen el agente anticancerígeno salinosporamide A aislado de *Salinispora tropica*, que actualmente se encuentra en la fase clínica II de tratamiento contra cáncer (Maldonado *et al.* 2005a, Fenical *et al.* 2009); las marinomicinas A a D aisladas de cepas *Marinophilus* con actividad antitumoral y antibiótica; y el antibiótico abisomicina C obtenido a partir de cepas *Verrucosipora* (Fenical y Jensen 2006, Kwon *et al.* 2006).

Existen dos familias que son reconocidas por su gran producción de metabolitos secundarios: Streptomycetaceae y Micromonosporaceae (Magarvey *et al.* 2004, Fenical y Jensen 2006). El género *Salinispora* fue el primer descrito como puramente marino y pertenece a la familia Micromonosporaceae (Mincer *et al.* 2002, Maldonado *et al.* 2005a).

Salinispora spp. strains are an important target in marine sediment because of their great biotechnological potential (Feling *et al.* 2003, Charan *et al.* 2004). Due to its oceanographic characteristics, the Gulf of California represents a strategic site for the isolation of novel bioactive actinobacterial strains such as *Salinispora* spp. (Maldonado *et al.* 2009). Considering this antecedent, the objective of this research work was to evaluate the Gulf of California as a potential source of bioactive actinobacteria, mainly *Salinispora* strains, through isolation and biological activity testing.

MATERIAL AND METHODS

Study area

The Gulf of California is an extension of the Pacific Ocean located between the Baja California Peninsula and northwestern mainland Mexico. The sediment samples collected for this study were taken at two different locations on the west coast of the Gulf of California: Concepción Bay and los Ángeles Bay (fig. 1). The former, in the southern Gulf of California, has an average depth of 17 m (maximum of 30 m), sea surface water temperature values ranging from 18 to 32 °C, and average salinity values of 35 throughout the year. The latter, in the northern Gulf of California, has an average depth of 40 m, sea surface water temperature values ranging from 15 to 29.8 °C, and salinity values ranging from 35.25 to 35.55 (Canino-Herrera *et al.* 1990).

Culture and isolation of actinobacteria

Sediment samples were collected manually in April 2008 by Scuba diving or using a 12-cm diameter Kahlisco stainless steel dredge. Sampling method was according to the site's depth. In total, 43 samples were taken from diverse sites in Concepción Bay and los Ángeles Bay (table 1).

The collected sediment was dried in sterile Petri dishes and pulverized with a common mortar in the laboratory. Selective isolation of actinobacteria was done by the dry-stamp method (Mincer *et al.* 2002) using six culture media (Ensign 1978; Mincer *et al.* 2002; Gontang *et al.* 2007; Becerril-Espinosa 2011, Becerril-Espinosa *et al.* 2012): M1 (agar 18 g L⁻¹), M2 (mannitol 0.5 g L⁻¹, peptone 0.1 g L⁻¹, and agar 18 g L⁻¹), M3 (starch 1 g L⁻¹, peptone 0.2 g L⁻¹, yeast extract 0.4 g L⁻¹, and agar 18 g L⁻¹), M4 (mannitol 2.25 g L⁻¹, peptone 1 g L⁻¹, and agar 18 g L⁻¹), M5 (mannitol 2.25 g L⁻¹, casamino acids 0.2 g L⁻¹, and agar 18 g L⁻¹), and M6 (triptone 0.6 g L⁻¹, casitone 1 g L⁻¹, glucose 0.8 g L⁻¹, and agar 18 g L⁻¹). Cycloheximide (100 µg mL⁻¹) and riphampicine (5 µg mL⁻¹) were added to each culture medium as anti-fungal and antibiotic agents, respectively.

The cultures were incubated for 3–4 weeks until the actinobacteria colonies appeared. These colonies were isolated into a new solid culture medium: A1 (starch 10 g L⁻¹, yeast extract 4 g L⁻¹, peptone 2 g L⁻¹, and agar 18 g L⁻¹). The

Para este género, se han descrito dos especies: *Salinispora arenicola* y *S. tropica* (Maldonado *et al.* 2005a, Fenical y Jensen 2006, Jensen 2010). Una tercera especie, *S. pacifica*, ha sido propuesta por Jensen y Mafnas (2006). Más de 100 cepas pertenecientes al género *Salinispora* han sido cultivadas, y más del 80% han mostrado actividad antitumoral y 35% actividad antibiótica (Fenical y Jensen 2006).

El aislamiento de cepas de sedimento marino pertenecientes a *Salinispora* en la actualidad es de gran importancia debido a su alto potencial biotecnológico (Feling *et al.* 2003, Charan *et al.* 2004). El golfo de California, por sus características oceanográficas, representa un sitio estratégico para el aislamiento de cepas con actividad biológica como *Salinispora* (Maldonado *et al.* 2009). Considerando este antecedente, el objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial del golfo de California como un reservorio de actinobacterias bioactivas, principalmente cepas pertenecientes al género *Salinispora*, mediante el aislamiento y pruebas de actividad biológica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El golfo de California es una extensión del océano Pacífico localizado entre la península de Baja California y el noroeste de México. Para este estudio, se tomaron muestras de sedimento en dos diferentes localidades de la costa oeste del golfo de California: bahía Concepción y bahía de los Ángeles (fig. 1). Bahía Concepción, localizada en la región sur del golfo de California, tiene una profundidad promedio de 17 m (un máximo de 30 m), valores de temperatura superficial del agua entre 18 y 32 °C y valores de salinidad promedio de 35 durante todo el año. Bahía de los Ángeles, localizada en la región norte del golfo de California, tiene una profundidad promedio de 40 m, valores de temperatura superficial del agua entre los 15 y 29.8 °C y valores de salinidad que varían entre 32.25 y 35.55. (Canino-Herrera *et al.* 1990).

Cultivo y aislamiento de actinobacterias

Las muestras de sedimento fueron recolectadas manualmente en abril de 2008 mediante buceo libre o con el uso de una draga Kahlisco de acero inoxidable de 12 cm de diámetro. La técnica de recolección estuvo en función de la profundidad del sitio de muestreo. En total, se tomaron 43 muestras de sedimento de distintas localidades de bahía Concepción y bahía de los Ángeles (tabla 1).

En el laboratorio, el sedimento se secó en cajas de petri estériles y posteriormente se pulverizó con un mortero estéril. Las cepas de actinobacterias fueron aisladas selectivamente con la técnica de estampado seco (Mincer *et al.* 2002) en seis diferentes medios de cultivo (Ensign 1978; Mincer *et al.* 2002; Gontang *et al.* 2007; Becerril-Espinosa 2011, Becerril-Espinosa *et al.* 2012): M1 (18 g L⁻¹ de agar), M2 (0.5 g L⁻¹

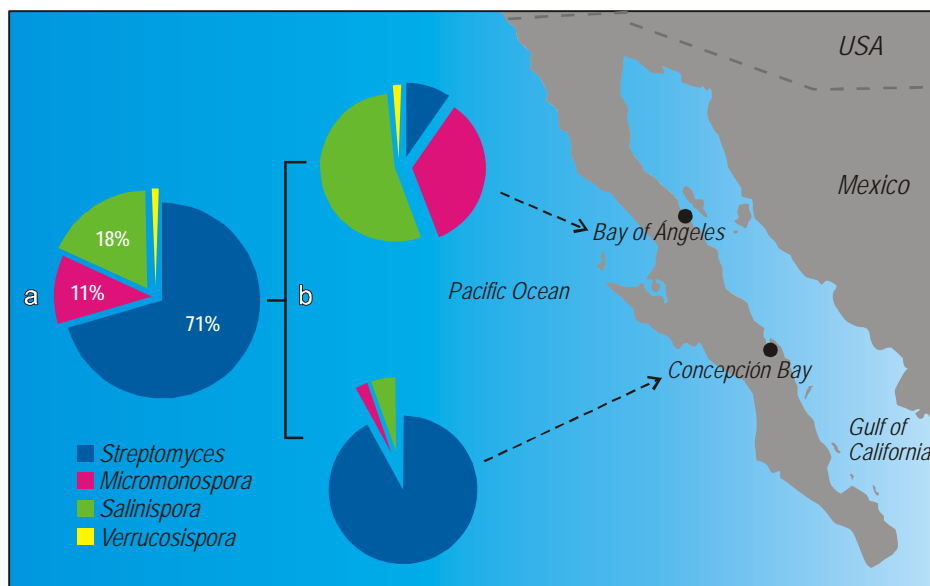


Figure 1. (a) Strains isolated per actinobacterial group: 166 (71%) were classified as *Streptomyces*-like strains, 42 (18%) as *Salinispora* sp., 26 (11%) as *Micromonospora* sp., and one (<1%) as *Verrucospora*. (b) Distribution of actinobacterial strains in the sampling area: 96% of the *Streptomyces*-like strains were obtained from Concepción Bay, while 79% of the *Micromonospora* and *Salinispora* strains were isolated from los Ángeles Bay sediment.

Figura 1. (a) Cepas aisladas por grupo de actinobacterias: 166 (71%) se clasificaron como tipo *Streptomyces*, 42 (18%) como *Salinispora* sp., 26 (11%) como *Micromonospora* sp. y 1 (<1%) como *Verrucospora*. (b) Distribución de actinobacterias a lo largo del área de muestreo: 96% de las cepas tipo *Streptomyces* fueron aisladas de sedimentos de bahía Concepción, mientras que 79% de las cepas *Micromonospora* y *Salinispora* fueron aisladas de bahía de los Ángeles.

pure strains were inoculated into 10 mL A1 liquid medium and incubated at 2100 rpm and 28 °C. After 10 days incubation, they were scaled up to 100 mL A1 culture medium to obtain the organic extracts.

Seawater requirement for growth

All pure isolated strains were inoculated into A1 solid culture medium prepared with distilled and deionized water (dd H₂O). After a four-week incubation period, the requirement of seawater for growth was registered for each strain tested. The presence of a well-defined colony in the plate was indicative of no seawater requirement for growth and was thus discarded as a possible *Salinispora* strain. Conversely, the absence of a colony was considered indicative of seawater requirement for growth and, therefore, a possible *Salinispora* strain.

Extraction of compounds, biological activity assays, and chemical characterization

All the actinobacterial cultures were extracted using the following procedure. Each culture medium was filtered with a commercial filter to separate the cellular mass from the liquid medium. The cellular mass was extracted using 100% methanol (MeOH), subjected to constant shaking during

de manitol, 0.1 g L⁻¹ de peptona y 18 g L⁻¹ de agar), M3 (1 g L⁻¹ de almidón, 0.2 g L⁻¹ de peptona, 0.4 g L⁻¹ de extracto de levadura y 18 g L⁻¹ de agar), M4 (2.25 g L⁻¹ de manitol, 1 g L⁻¹ de peptona y 18 g L⁻¹ de agar), M5 (2.25 g L⁻¹ de manitol, 0.2 g L⁻¹ de casaminoácidos y 18 g L⁻¹ de agar) y M6 (0.6 g L⁻¹ de triptona, 1 g L⁻¹ de casitona, 0.8 g L⁻¹ de glucosa y 18 g L⁻¹ de agar). Se adicionó ciclohexamida (100 µg mL⁻¹) y rifampicina (5 µg mL⁻¹) a cada medio de cultivo como agentes antimicótico y antibiótico, respectivamente.

Las cajas de cultivo se dejaron incubar por un periodo de tres a cuatro semanas hasta la aparición de colonias de actinobacterias. Las colonias de actinobacterias se pasaron a un nuevo medio de cultivo sólido: A1 (10 g L⁻¹ de almidón, 4 g L⁻¹ de extracto de levadura, 2 g L⁻¹ de peptona y 18 g L⁻¹ de agar). Posteriormente, las cepas puras de actinobacterias se transfirieron a 10 mL de medio líquido A1 y se incubaron a 28 °C a 2100 rpm. Después de una incubación de 10 días, los cultivos se escalaron a 100 mL de medio A1 para la obtención de los extractos orgánicos.

Prueba de requerimiento de agua de mar para crecimiento

Todas las cepas de actinobacterias puras se inocularon en medio de cultivo A1 sólido preparado con agua destilada

Table 1. Total number of samples collected. The number of samples collected per sampling site and the average depth at which they were taken are shown.

Tabla 1. Número total de muestras recolectadas. Se indica el número de muestras recolectadas por sitio de muestreo y la profundidad promedio a la cual se recolectaron.

| Location | Number of samples per site | Average depth sampled (m) |
|-------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Concepción Bay | | |
| Playa Armenta | 6 | 20 |
| El Coyote | 5 | |
| El Requesón | 7 | |
| Santispac | 19 | |
| Total number of samples | 37 | |
| Los Ángeles Bay | | |
| | 6 | 100 |
| Total number of samples | 6 | |

24 h, and finally concentrated using reduced pressure distillation; 100 mL of ethyl acetate (EtOAc) was added to the liquid medium to use a liquid-liquid extraction method with a separation funnel. The organic phases were dried by reduced pressure distillation. Amberlite XAD7HP resin (20 g L⁻¹ of culture) was added to the aqueous phases, and subjected to 24 h of constant shaking for compound retention. The Amberlite was then filtered and extracted with 100 mL of MeOH and constantly shaken for 3 h. After the extraction period, MeOH was removed by reduced pressure distillation.

The EtOAc and MeOH extracts obtained were tested for cytotoxic and antimicrobial activity. Three different cancer cell lines were used for the cytotoxicity assays: breast (MCF7), cervical (HeLa), and lung (H460).

The cytotoxicity assays on the H460 cell line were performed following the method described by Villarreal-Gómez *et al.* (2010) for colon cancer cell line HCT-116. In a 96-well plate, a serial dilution of the extracts was done at an initial concentration of 10 mg mL⁻¹ until reaching a final concentration of 20 µg mL⁻¹. After 72 h incubation, the percentage of viable cells was calculated based on the absorbance values at 490 nm. The activity values were expressed as survival percentage and all those that showed less than 50% survival of H460 cells were considered active.

The assays on the MCF7 and HeLa cell lines were performed modifying the method described by Villarreal-Gómez *et al.* (2010) to test the extracts at a final concentration of 20 µg mL⁻¹ with no serial dilution. A 96-well plate was used; 100 µL of the cell suspension in RPMI (Roswell Park Memorial Institute) cell culture medium were added at a density of 5 × 10³ cells per well. Then, 20 µL of diluted extract in dd H₂O were added to each well (final concentration of 20 µg mL⁻¹); each extract was tested in triplicate. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (10% final concentration) was used as positive control (0% survival), dd H₂O as negative control (100% survival), and RPMI culture medium as blank. After

y desionizada (dd H₂O). Después de cuatro semanas de incubación, la presencia de una colonia bien formada y definida se consideró como indicador de no requerimiento de agua de mar para el crecimiento y, por lo tanto, como no perteneciente al género *Salinispora*. De forma contraria, la ausencia de una colonia se consideró como indicador de requerimiento de agua de mar para el crecimiento y, por lo tanto, como posiblemente perteneciente al género *Salinispora*.

Extracción de compuestos, ensayos de bioactividad y caracterización química

El procedimiento para la extracción de los cultivos bacterianos fue el siguiente en todos los casos. El medio de cultivo se filtró con la finalidad de separar la masa bacteriana de la fracción líquida del cultivo. La masa celular se extrajo con metanol absoluto (MeOH) y se mantuvo en constante agitación durante 24 h. El extracto se concentró por destilación a presión reducida hasta sequedad. El residuo líquido del medio de cultivo se extrajo mediante partición con 100 mL de acetato de etilo (AcOEt). La fase orgánica se concentró mediante destilación a presión reducida. A la fase acuosa se le agregó resina Amberlite XAD7HP (20 g L⁻¹ de cultivo) y se dejó en agitación constante por 24 h. Posteriormente, la amberlita se filtró y a la fracción sólida se le agregaron 100 mL de MeOH para la extracción de compuestos y se dejó en constante agitación por 3 h. Después, se eliminó la resina mediante filtración y se concentró el filtrado mediante destilación a presión reducida.

Los ensayos de actividad citotóxica y antimicrobiana se realizaron con los extractos de AcOEt y MeOH obtenidos. Para los ensayos de actividad citotóxica, se utilizaron tres líneas celulares diferentes: cáncer de mama (MCF7), cáncer de cérvix (HeLa) y cáncer de pulmón (H460).

Los ensayos contra la línea celular H460 se realizaron con el método descrito por Villarreal-Gómez *et al.* (2010) para ensayos con líneas celulares de cáncer de colon HCT-116. En una placa de 96 pozos se realizó la dilución serial de los extractos con una concentración inicial de 10 mg mL⁻¹ hasta una concentración final de 20 µg mL⁻¹. Después de 72 h de incubación, se calculó el porcentaje de células viables con base en los valores de absorbancia a 490 nm. Los valores de actividad citotóxica fueron expresados como porcentaje de supervivencia y todos aquellos que presentaron menos del 50% de supervivencia de células H460 se consideraron activos.

Para los ensayos de las líneas celulares MCF7 y HeLa, se tomó como base el método descrito por Villarreal-Gómez *et al.* (2010) con la modificación de probar los extractos a una concentración final de 20 µg mL⁻¹ sin dilución serial. Se utilizaron placas de 96 pozos a las que se les agregaron 100 µL de suspensión celular en medio de cultivo para líneas celulares RPMI (Roswell Park Memorial Institute) a una densidad de

24 h of incubation in an atmosphere of 37 °C and 5% CO₂, the percentage of viable cells was quantified using the CellTiter (Promega) cell proliferation assay. This colorimetric method allows quantifying the amount of formazan produced by metabolic active cells also considered viable. The value of absorbance at 495 nm is relative to the number of viable cells in each well (Promega Technical Bulletin 2009). We added 20 µL of the CellTiter revealing solution to each well and the plate was left to incubate for 3 h. Absorbance readings were taken in an ELISA reader at 495 nm. The average absorbance value of the negative control was considered 100% survival; all the extracts with less than 50% survival were considered active. Cell viability was checked using the Olympus Vanux-S inverted microscope at the Microbiology Department of the Center for Scientific Research and Higher Education at Ensenada (CICESE). Physical proof of cellular lysis was corroborated in those wells where less than 50% survival was calculated.

The antimicrobial activity assays were carried out using the aqueous MeOH extracts only. Extracts were diluted in DMSO to a final concentration of 100 mg mL⁻¹ (Millán-Aguiñaga *et al.* 2010). Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii*), Gram-positive bacteria (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Staphylococcus aureus*), and the yeast *Candida albicans* were used as pathogenic agents.

Pathogens were cultured in 96-well plates using Luria Broth for Gram-negative bacteria and Tryptic Soy Broth and Yeast Mold Broth for Gram-positive bacteria and the yeast, respectively. Different antibiotics were used as positive control and DMSO as negative control. Samples and controls were tested in triplicate. After 24 h incubation, plates were read in an ELISA reader as single reads within the absorbance range of 405 to 620 nm (Millán-Aguiñaga *et al.* 2010). The absorbance range used was chosen based on the optical density principle. This principle considers that individual bacterial cells have no color, but that their growth increases the turbidity in the culture medium. Thus, those absorbance wavelengths that allow the detection of this change in turbidity were used. Antimicrobial activity was expressed following the same criteria as the cytotoxicity assays. The average of the negative control absorbance values was considered 100% survival. All extracts that showed less than 50% survival were considered active.

Liquid chromatography with mass spectrometry (LC-MS) was applied for the initial chemical characterization of the biologically active organic extracts. The analysis was done using a LC-MS Hewlett-Packard MSD 1100 system with a C-18 RP column and an acetonitrile:water gradient of 10–100%. A chromatogram, ultraviolet (UV) spectrum, and mass spectrum were obtained for each sample. Molecular weights and UV signals were used to identify known or unknown compounds related to the biological activity observed. Molecular weights that did not show a UV-related signal were sought in the Antimarin 707 ChemFinder

5 × 10³ cél por pozo. Posteriormente, se agregaron 20 µL de extracto diluido en dd H₂O (20 µg mL⁻¹ concentración final por pozo) por triplicado. Se utilizaron sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 10% como control positivo (0% de supervivencia), dd H₂O como control negativo (100% supervivencia) y medio RPMI como blanco. La placa se dejó incubar por 24 h en una atmósfera de 37 °C al 5% CO₂. Posterior al periodo de incubación, se cuantificó el porcentaje de células viables con el método colorimétrico de proliferación celular CellTiter (Promega). Este método permite cuantificar la cantidad de formazán producido por células metabólicamente activas, consideradas en este caso como viables. El valor de absorbancia a 495 nm es proporcional al número de células viables en cada pozo (Boletín Técnico Promega 2009). Se agregaron 20 µL de la solución reveladora CellTiter a cada pozo, y la placa se dejó incubar por 3 h bajo las condiciones de incubación antes descritas. La placa se procesó en un lector ELISA como una sola lectura, de donde se obtuvieron las absorbancias de cada pozo a 495 nm. El promedio de las absorbancias del control negativo se consideró el 100% de supervivencia; todos los extractos que presentaron en promedio un porcentaje de supervivencia menor que el 50% fueron considerados activos. La viabilidad de las células se corroboró con observaciones en el microscopio invertido Olympus Vanux-S del Departamento de Microbiología del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Se corroboró que en aquellos pozos en los que se calculó un porcentaje de supervivencia menor que el 50% existiera prueba física de lisis celular.

La actividad antimicrobiana se probó únicamente con los extractos en MeOH de la fase acuosa. Los extractos fueron diluidos en DMSO a una concentración final de 100 mg mL⁻¹ (Millán-Aguiñaga *et al.* 2010). Se utilizaron como agentes patógenos cepas de bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*) y Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA) y *Staphylococcus aureus*), así como de la levadura *Candida albicans*.

Los patógenos fueron cultivados en placas de 96 pozos con medio de cultivo Caldo LB (*Luria Broth*) para las bacterias Gram-negativas, Caldo Soya Triptica y Caldo YM (*Yeast Mold*) para las bacterias Gram-positivas y la levadura, respectivamente. Se utilizaron distintos antibióticos como control positivo y DMSO como control negativo. Las muestras y controles se probaron por triplicado. Después de 24 h de incubación, la placa se leyó en un lector de ELISA con un barrido simple dentro del intervalo de absorbancias de 405 a 620 nm (Millán-Aguiñaga *et al.* 2010). El intervalo de longitudes de onda utilizado en el ensayo se eligió con base en el principio de densidad óptica. Este principio considera que las células bacterianas son incoloras mas su crecimiento tiene como consecuencia el incremento de turbidez en el medio de cultivo; por lo tanto, se utilizaron aquellas longitudes de onda que permitieron detectar cambios de turbidez en los diferentes medios de cultivo. La actividad antimicrobiana

database in order to determine if they had been previously reported for marine actinobacteria, and relate their presence to the biological activity observed.

Diversity of bioactive strains

The genetic identification of active actinobacteria was done according to the 16S rRNA analysis. The genomic DNA of each isolate was extracted using the DNeasy Blood and Tissue Kit following the protocol suggested by the manufacturer (Qiagen Inc., CA, USA). The 16S rRNA amplifications were sequenced using the FC27 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and RC1492 (5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3') primers, under the following conditions: initial denaturalization at 95 °C for 15 min, followed by 32 cycles at 95 °C for 1 min, 61 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 7 min (Becerril-Espinosa 2011, Gontang *et al.* 2007). The PCR products were purified using the QIAquick PCR Purification Kit as indicated by the manufacturer (Qiagen Inc.). Sequences were obtained by SeqXcel Inc. (<http://www.seqxcel.com/>) using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Chemistry 3.1 technique for the Genetic Analyzer ABI Prism 3100 (Applied Biosystem). The length range of the sequences considered for the phylogenetic analysis was from 500 to 700 bp (Becerril-Espinosa 2011).

The 16S rRNA sequence from each isolate was compared with the available sequences in BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) from the GenBank database (www.ncbi.nlm.nih.gov/). Sequence alignment was done using the ClustalX program and Bioedit with the manual alignment option. The phylogenetic tree was constructed using the Mega 5.0 program at 97% similarity and the neighbor-joining algorithm with 10,000 replicates (Becerril-Espinosa 2011).

RESULTS

Abundance of actinobacteria and diversity of bioactive strains

The isolated actinobacterial strains were initially classified into three groups based on morphology and seawater requirements. A total of 235 strains were isolated: 166 (71%) *Streptomyces*-like, 26 (11%) *Micromonospora*-like, and 42 (18%) *Salinispora*-like (fig. 1a).

Actinobacteria classified as *Streptomyces*-like formed raised, convex colonies with well-developed air hyphae and filamentous mycelium with white-gray velvet textured spores; these are common characteristics previously observed for the family Streptomycetaceae (Anderson and Wellington 2001; Lo *et al.* 2002; Sujatha *et al.* 2005; Bredholt *et al.* 2007, 2008). Actinobacterial strains showing no air hyphae or apparent filamentous mycelium in the colony morphology, and with solid texture and colony colors in different orange

se expresó en porcentaje de supervivencia bajo el mismo criterio de los ensayos de citotoxicidad. El promedio de las absorbancias del control negativo se consideró el 100% de supervivencia; todos los extractos que presentaron en promedio un porcentaje de supervivencia menor que el 50% fueron considerados activos.

Los extractos con actividad biológica (citotóxica y/o antimicrobiana) se analizaron mediante cromatografía líquida con detector de masas (LC-MS, por sus siglas en inglés) para la caracterización química inicial. Se utilizó un equipo Hewlett-Packard MSD 1100 con una columna C-18 RP y un gradiente de acetonitrilo:agua de 10–100%. Para cada muestra, se obtuvo un cromatograma, el espectro ultravioleta (UV) y el espectro de masas. Los pesos moleculares y las absorciones en el UV se utilizaron para identificar la presencia de compuestos previamente documentados y no documentados que tuvieran relación con la actividad biológica observada. Los pesos moleculares que no pudieron mostrar absorción en el UV fueron buscados en la base de datos Antimarin 707 ChemFinder para conocer si estos habían sido previamente descritos para actinobacterias marinas y relacionar su presencia con la actividad observada.

Diversidad de cepas bioactivas

La identificación genética de las cepas de actinobacterias con actividad biológica se realizó con el análisis del gen 16S del ARNr. El ADN de cada cepa se extrajo utilizando un kit de extracción para ADN (DNeasy Blood and Tissue Kit) y siguiendo el protocolo sugerido por el proveedor (Qiagen Inc., California, EUA). La amplificación del gen 16S del ARNr fue secuenciada con los cebadores FC27 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y RC1492 (5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3'), con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C por 15 min seguida de 32 ciclos a 95 °C por 1 min, 61 °C por 1 min y 72 °C por 1 min, y la extensión final a 72 °C por 7 min (Becerril-Espinosa 2011, Gontang *et al.* 2007). Los productos de PCR fueron purificados con el kit QIAquickPCR siguiendo el protocolo indicado por el proveedor (Qiagen Inc.). Las secuencias se obtuvieron por SeqXcel Inc. (<http://www.seqxcel.com/>) con el uso de la técnica BigDye Terminator Cycle Sequencing Chemistry 3.1 del analizador Genetic Analyzer ABI Prism 3100 (Applied Biosystem). El intervalo de tamaño de las secuencias consideradas para el análisis filogenético fue de 500 a 700 pb (Becerril-Espinosa 2011).

La secuencia del gen 16S del ARNr de cada cepa se comparó con las secuencias disponibles en la base de datos BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) del GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/). Las secuencias fueron alineadas con los programas ClustalX y Bioedit con la opción de alineación manual. El árbol filogenético fue construido a un porcentaje de similitud entre secuencias del 97% con el algoritmo del vecino más cercano con 10,000 replicas en el programa Mega 5.0 (Becerril-Espinosa 2011).

tones with mainly black or dark orange spores, were classified within the *Micromonospora*-like group; these are characteristics reported for the family Micromonosporaceae (Jensen *et al.* 1991; Mincer *et al.* 2002; Bredholt *et al.* 2007, 2008). Some of the strains in the *Micromonospora*-like group showed seawater growth specificity, a characteristic mainly observed for actinobacteria of the genus *Salinispora*, so they were reclassified within the *Salinispora*-like group (Maldonado *et al.* 2005a; Bredholt *et al.* 2007, 2008).

Since the genetic analysis was prioritized based on the bioactivity results, 16S rRNA analysis was not done for the *Streptomyces*-like strains in this study. A strong correlation was observed between the morphological classification system and the genetic identification for *Micromonospora*- and *Salinispora*-like strains. Comparisons between the initial classification system based on morphology and 16S rRNA analysis have been previously done by Jensen *et al.* (1991) and Bredholt *et al.* (2007), who reported a compatibility

RESULTADOS

Abundancia de actinobacterias y diversidad de cepas bioactivas

Las cepas de actinobacterias fueron inicialmente clasificadas en tres grupos principales con base en su morfología y requerimiento de agua de mar (iones) para su crecimiento. En total, se aislaron 235 cepas de actinobacterias: 166 (71%) tipo *Streptomyces*, 26 (11%) tipo *Micromonospora* y 42 (18%) tipo *Salinispora* (fig. 1a).

Las cepas clasificadas como tipo *Streptomyces* se caracterizaron por la formación de colonias convexas con hifas desarrolladas y micelio filamentosos con esporas de colores gris y blanco y textura aterciopelada; estas características han sido previamente descritas para representantes de la familia Streptomycetaceae (Anderson y Wellington 2001; Lo *et al.* 2002; Sujatha *et al.* 2005; Bredholt *et al.* 2007, 2008). Las cepas

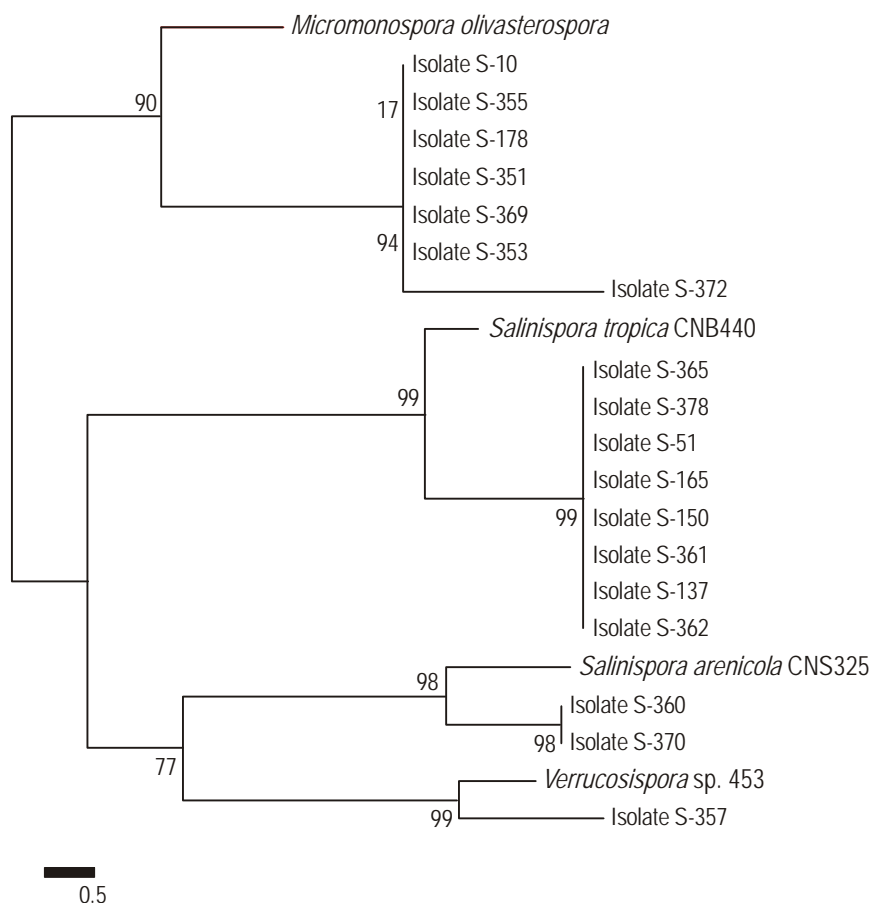


Figure 2. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing relationships between selected isolates and the genera *Micromonospora*, *Salinispora*, and *Verrucosipora*. The tree was constructed using the neighbor-joining method and the program MEGA4 (1000 bootstrap replicates; data is shown at the nodes).

Figura 2. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen 16S del ARNr que muestra las relaciones entre los aislados seleccionados y los géneros *Micromonospora*, *Salinispora* y *Verrucosipora*. El árbol fue construido utilizando el método del vecino más cercano (*Neighbor-Joining*) y el programa MEGA4 (1000 réplicas de arranque; el conjunto de datos se muestra en los nodos).

percentage of 90–95% for actinobacterial isolates. In the present study, 98–99% compatibility was observed. *Micromonospora*- and *Salinispora*-like strains were genetically identified at 97% similarity with respect to the representative sequences belonging to these genera, except for strain S-357, identified as belonging to the genus *Verrucosipora* (fig. 2).

In this study it was possible to observe location specificity among actinobacterial groups: 96% of the *Streptomyces*-like strains were obtained from Concepción Bay, while 79% of the *Micromonospora* and *Salinispora* strains, and the sole *Verrucosipora* strain were isolated from los Ángeles Bay (fig. 1b).

Biological activity

Sixty-nine extracts were obtained from *Micromonospora*, *Salinispora*, and *Verrucosipora* strains. A total of 17 (24%) organic extracts (AcOEt) showed biological activity (cytotoxic and antimicrobial), 15 of which showed cytotoxic activity against breast cancer cells (MCF7) and 9 against cervical cancer cells (HeLa). None of the organic extracts tested showed activity against lung cancer cells (H460). The highest activity values observed were 20–25% against MCF7 cells (strains S-365, S-355 and S-361) and 24–25% against HeLa cells (strains S-165, S-361, and S-353). The aqueous extracts (MeOH) showed no cytotoxic activity against any cancer cells (table 2).

Regarding the antimicrobial activity, only three aqueous extracts (MeOH) showed antimicrobial activity towards MRSA, with activity values of 3%, 6%, and 32% (strains S-370, S-369, and S-355, respectively) (table 2).

Fifty-eight percent of the strains that showed the highest cytotoxic and antimicrobial activity values were recovered from los Ángeles Bay and identified as belonging to the genus *Salinispora* (table 2).

Chemical characterization of extracts

The initial approach to the chemical characterization of the crude extracts was to confirm the presence of previously reported compounds for marine strains belonging to the genera *Micromonospora* and *Salinispora* that could explain the biological activity obtained.

The chromatograms obtained for the different extracts tested (AcOEt and MeOH) showed clear, well-defined signal patterns characteristic for each type of extract. Organic extracts showed the majority of signals between 12 and 18 min retention time (RT) and signals with mass/charge (m/z) relationship values from 244 to 300; in comparison, aqueous extracts showed most signals between 19 and 19.8 min RT and m/z values from 350 to 590.

The signals in the UV spectrum showed 97–99% similarity for antibiotic and anticancer compounds such as gramicidin D (RT = 11.7–12.92 min), chlorothricin

que en la morfología de su colonia no mostraron desarrollo de hifas ni micelio filamentoso, y con textura sólida de color anaranjado y con esporas negras o anaranjadas, fueron clasificadas como tipo *Micromonospora*; estas características han sido previamente registradas para la familia Micromonosporaceae (Mincer *et al.* 2002; Jensen *et al.* 1991; Bredholt *et al.* 2007, 2008). Algunas de las cepas clasificadas como tipo *Micromonospora* presentaron estricto requerimiento de agua de mar para su crecimiento, característica descrita principalmente para el género *Salinispora*, por lo que fueron reclasificadas como tipo *Salinispora* (Maldonado *et al.* 2005a; Bredholt *et al.* 2007, 2008).

Debido a que la identificación genética fue prioritaria para aquellas cepas con potencial actividad biológica, no se obtuvieron resultados de la secuenciación parcial del gen 16S del ARNr para las cepas tipo *Streptomyces*. Se observó una alta correlación entre el sistema de clasificación con base en la morfología de las colonias y la identificación genética para las cepas tipo *Micromonospora* y *Salinispora*. Estudios previos en donde se compara la clasificación inicial con base en la morfología de las colonias y la identificación genética con base en la secuenciación del gen 16S del ARNr para diferentes cepas de actinobacterias han registrado un intervalo de compatibilidad del 90% al 95% (Jensen *et al.* 1991, Bredholt *et al.* 2007). En este estudio se observó una compatibilidad entre el 98% y 99%. Las cepas clasificadas morfológicamente como tipo *Micromonospora* y *Salinispora* fueron identificadas con un 97% de similitud con respecto a las secuencias representativas como miembros de estos géneros, con excepción de la cepa S-357 que fue identificada como perteneciente al género *Verrucosipora* (fig. 2).

En este estudio se observó una distribución específica de los grupos de actinobacterias encontrados: 96% de las cepas tipo *Streptomyces* fueron obtenidas de sedimentos de bahía Concepción, mientras que 79% de las cepas identificadas como *Micromonospora*, *Salinispora* y *Verrucosipora* fueron aisladas de sedimento de bahía de los Ángeles (fig. 1b).

Actividad biológica

Se obtuvieron 69 extractos crudos de las cepas identificadas como *Micromonospora*, *Salinispora* y *Verrucosipora*. En total, 17 (24%) extractos orgánicos (AcOEt) mostraron actividad biológica (citotóxica y antimicrobiana), de los cuales 15 tuvieron actividad citotóxica contra la línea celular MCF7 y 9 contra la línea celular HeLa. Ningún extracto orgánico mostró actividad citotóxica contra la línea celular H460. Los valores máximos de actividad observados fueron de 20–25% de supervivencia contra MCF7 (cepas S-365, S-355 y S-361) y de 24–25% de supervivencia contra HeLa (cepas S-165, S-361 y S-353). La fase acuosa (MeOH) de los extractos no mostró tener actividad citotóxica contra ninguna de las líneas celulares de cáncer probadas (tabla 2).

Con respecto a la actividad antimicrobiana, solamente tres extractos en su fase acuosa (MeOH) mostraron actividad

Table 2. Highest cytotoxic and antimicrobial activity values (survival percentage) against breast (MCF7) and cervical (HeLa) cancer cell lines, and the Gram-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain observed for different extracts. Seawater requirement (SWR) for growth (requirement, +; no requirement, -), genera, and sampling site from which isolates were obtained (los Ángeles Bay, AB; Concepción Bay, CB) are indicated. The type of active aqueous extract is indicated as the name of the solvent (ethyl acetate, EtOAc; methanol, MeOH). The asterisk indicates that the MeOH extract was only active towards the MRSA strain.

Tabla 2. Los más altos valores de actividad citotóxica y antimicrobiana observada para diferentes extractos (porcentaje de supervivencia) contra las líneas celulares de cáncer de mama (MCF7) y cervical (HeLa), y la cepa Gram-positivo *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). Se indican los requerimientos de agua de mar (SWR) para el crecimiento (requisito, +; no requisito, -), los géneros, y el sitio de muestreo del cual se obtuvieron los aislados (bahía de los Ángeles, AB; bahía Concepción, CB). El tipo de extracto activo se indica con el nombre del disolvente (acetato de etilo, EtOAc; metanol, MeOH). El asterisco indica que el extracto MeOH fue activo solamente con la cepa de MRSA.

| Strain code | SRW | Sampling site | Genus | Aqueous extract solvent | Biological activity (survival %) | | |
|-------------|-----|---------------|-----------------------|-------------------------|----------------------------------|------|-------|
| | | | | | MCF7 | HeLa | MRSA* |
| S-10 | - | AB | <i>Micromonospora</i> | EtOAc | 39 | - | - |
| S-51 | + | AB | <i>Salinispora</i> | EtOAc | 46 | - | - |
| S-137 | + | AB | <i>Salinispora</i> | EtOAc | 41 | 48 | - |
| S-150 | + | AB | <i>Salinispora</i> | EtOAc | 32 | - | - |
| S-165 | + | AB | <i>Salinispora</i> | EtOAc | 38 | 25 | - |
| S-178 | - | AB | <i>Micromonospora</i> | EtOAc | 30 | 49 | - |
| S-351 | - | CB | <i>Micromonospora</i> | EtOAc | - | 45 | - |
| S-353 | - | CB | <i>Micromonospora</i> | EtOAc | 27 | 25 | - |
| S-355 | - | AB | <i>Micromonospora</i> | EtOAc/MeOH* | 20 | - | 32 |
| S-360 | + | AB | <i>Salinispora</i> | EtOAc | 38 | - | - |
| S-361 | + | AB | <i>Salinispora</i> | EtOAc | 25 | 24 | - |
| S-362 | + | AB | <i>Salinispora</i> | EtOAc | 41 | 36 | - |
| S-365 | + | AB | <i>Salinispora</i> | EtOAc | 32 | - | - |
| S-369 | - | AB | <i>Micromonospora</i> | EtOAc/MeOH* | 35 | 28 | 6 |
| S-370 | + | AB | <i>Salinispora</i> | EtOAc/MeOH* | - | - | 3 |
| S-372 | - | AB | <i>Micromonospora</i> | EtOAc | 29 | 26 | - |
| S-378 | + | AB | <i>Salinispora</i> | EtOAc | 32 | - | - |

(RT = 14.62 min), and cyclosporin B and C (RT = 20.10 min), isolated from *Bacillus brevis*, *Streptomyces* sp., and *Bauveria nivea*, respectively. Signals corresponding to compounds related to the genus *Streptomyces*, such as bacithracin (RT = 16.45 min), vancomycin (RT = 19.54 min), and niphithricin B (RT = 20.00 min), were also detected.

The comparison of m/z based on mass spectrometry analysis (which may not have UV signal) was more useful for the initial chemical characterization of extracts. Common masses were observed in the spectra analyzed, most of them corresponding to previously reported compounds for *Streptomyces* strains, such as mutamycin (m/z 491.536 corresponding to the molecular ion [M⁺]) isolated from *S. caespitosus*. We also detected compounds with biological activity that had been previously reported for different *Micromonospora* species, such as the antibiotics fortimicins AP, KE, and AM (m/z 334.412), mycinamicin (m/z 505.687 M⁺), gentamine (m/z 290.353 M⁺), and the cell inhibitor macquarimicin (m/z 370.496 M⁺), obtained from *M. olivoasterospora*,

contra el patógeno MRSA, con valores de actividad de 3%, 6% y 32% de supervivencia (cepas S-370, S-369 y S-355, respectivamente) (tabla 2).

Cincuenta y ocho por ciento de las cepas que presentaron los valores de actividad citotóxica y antimicrobiana más altos fueron recuperadas de bahía de los Ángeles e identificadas como pertenecientes al género *Salinispora* (tabla 2).

Caracterización química de los extractos

La aproximación inicial de la caracterización química de los extractos crudos consistió en corroborar la presencia de los compuestos previamente registrados para cepas marinas de los géneros *Micromonospora* y *Salinispora* que explicaran la actividad biológica observada.

Los cromatogramas obtenidos para los diferentes extractos (AcOEt y MeOH) mostraron patrones de señales claros y bien definidos para cada caso. Los extractos orgánicos mostraron la mayoría de las señales en un intervalo de tiempo de

M. griseorubida, and *M. chalcea*. Even though these bioactive compounds may explain the biological activity shown by the *Micromonospora* isolates in this study, they have not been reported for a marine strain before.

DISCUSSION

Abundance of actinobacteria and diversity of bioactive strains

It has been reported that sediment pretreatment (serial dilutions and plate stamping) may influence strain recovery and overestimate the abundance of those strains that are actually metabolically active in the marine environment, since it is not possible to differentiate those that are in a dormant state in the environment (Becerril-Espinosa 2011, Becerril-Espinosa *et al.* 2012). Therefore, the total amount of actinobacteria recovered corresponds only to the cultivable actinobacteria in the sediment samples and to those that were metabolically active under the culturing conditions used in this study (Jensen *et al.* 1991, Takizawa *et al.* 1993).

Maldonado *et al.* (2009) evaluated the abundance and diversity of actinobacteria in the Gulf of California based on 16S rRNA analysis. They reported nine different genera, including *Micromonospora*, *Salinispora*, and *Verrucosipora* that were also recovered in our study despite differences in the sampling strategy and culture techniques used. The different isolation techniques and culture media used and sampling sites might explain the variation in the recovery of certain genera reported by Maldonado *et al.* (2009) and the present study. Nevertheless, the use of selective isolation techniques and media allowed us to recover important bioactive strains.

The specific environmental characteristics of the different sampling sites and locations (e.g., type of sediment, distance from shore, depth) may explain the specific distribution and abundance of actinobacteria found in this study. Furthermore, based on these characteristics we consider the sampling sites to be representative environments of the northern and southern regions of the Gulf of California. Therefore, the difference in the abundance and distribution of the recovered strains is also considered representative of the environmental diversity in the Gulf of California.

It has been reported that *Streptomyces* strains are abundant in terrigenous-influenced nearshore sites (Jensen *et al.* 1991, Takizawa *et al.* 1993, Moran *et al.* 1995). The Concepción Bay samples were collected in a shallow environment where terrestrial material is abundant as a result of the rainfall washout during the summer and wind-driven sediment transport (Rodríguez-Meza *et al.* 2009). Terrestrial *Streptomyces* strains have been found to have a high tolerance for saline environments. Under these circumstances *Streptomyces* strains produce resistant spores that can be transported to the marine environment where they are stored and later, under appropriate conditions, develop into a colony (Jensen *et al.* 1991, Moran *et al.* 1995). The high abundance

retención (TR) de 12 a 18 min con señales de 244 hasta 300 de relación masa/carga (m/z), mientras que los extractos acuosos mostraron valores TR de 19 a 19.8 min para la mayoría de las señales y valores de m/z 350 hasta 590.

Las señales del espectro UV tuvieron un porcentaje de similitud del 97–99% con compuestos antibióticos y antitumorales como la gramicidina D (TR = 11.7–12.92 min), clorotricina (TR = 14.62 min) y ciclosporina B y C (TR = 20.10 min), aislados previamente de *Bacillus brevis*, *Streptomyces* sp. y *Bauveria nivea*, respectivamente. También fueron identificadas señales correspondientes a compuestos aislados del género *Streptomyces*, como la bacitracina (TR = 16.45 min), vancomicina (TR = 19.54 min) y nifitricina B (TR = 20.00 min).

La comparación de las m/z (que podían no tener señal UV) con base en el análisis de espectrometría de masas resultó más útil para la caracterización inicial de los extractos crudos. Valores de peso molecular fueron observados repetitivamente en los diferentes espectros analizados, la mayoría correspondientes a compuestos previamente documentados para el género *Streptomyces*, como la mutamicina (m/z 491.536 correspondiente al ión molecular [M⁺]) obtenida de *S. caespitosus*. De igual manera, compuestos con actividad biológica documentados para distintas especies de *Micromonospora* también fueron detectados, como los antibióticos fortamicina AP, KE y AM, micinamicina (m/z 505.687 M⁺), gentamina (m/z 290.353 M⁺) y el inhibidor celular macquarimicina (m/z 370.496 M⁺), obtenidos de *M. olivoasterospona*, *M. griseorubida* y *M. chalcea*. Aunque la presencia de estos compuestos puede explicar la actividad observada de los extractos obtenidos de cepas de *Micromonospora*, éstos no han sido registrados anteriormente para cepas marinas.

DISCUSIÓN

Abundancia de actinobacterias y diversidad de cepas bioactivas

Se ha documentado que el pretratamiento del sedimento (diluciones seriales y estampado en placa) puede influir en la recuperación de cepas y sobreestimar la abundancia de las cepas que realmente son metabólicamente activas en el medio marino, pues no se diferencia entre aquellas que se encuentran en estado latente en su medio (Becerril-Espinosa 2011, Becerril-Espinosa *et al.* 2012). Por lo tanto, se debe considerar que el número total de actinobacterias aisladas corresponde a la fracción cultivable de éstas en las muestras de sedimento y a aquellas que resultaron metabólicamente activas bajo las condiciones de cultivo utilizadas (Jensen *et al.* 1991, Takizawa *et al.* 1993).

Maldonado *et al.* (2009) realizaron un estudio en el golfo de California en el que se evaluó la diversidad y abundancia de actinobacterias con base en el análisis del gen 16S del ARNr. En su estudio identificaron nueve géneros de actinobacterias, incluyendo los géneros *Micromonospora*,

of *Streptomyces* strains in Concepción Bay can thus be explained due to their terrestrial origin, as well as to their adaptation to environmental changes in salinity and other physical and chemical factors in the shallow coastal marine environment (Jensen *et al.* 1991, Moran *et al.* 1995).

Micromonospora and *Salinispora* strains seem to be more abundant in deep, offshore areas where there is no terrestrial influence, as occurs in los Ángeles Bay. Different studies have obtained greatest recovery of *Micromonospora* and *Salinispora* from deep samples (≥ 100 m) (Jensen *et al.* 1991; Maldonado *et al.* 2005a, 2009; Jensen and Mafnas 2006). These actinobacterial genera are characterized for being highly tolerant to high salinity conditions and even show a requirement of seawater for growth (Jensen *et al.* 1991, Mincer *et al.* 2002, Jensen and Mafnas 2006). This implies adaptation to life in coastal environments, where the salinity gradient varies broadly, as well as in deep marine environments, where salinity conditions are more constant (Jensen *et al.* 1991, Mincer *et al.* 2002). The environmental characteristics of the sites where samples were collected explain the abundance observed for these two groups in los Ángeles Bay.

Biological activity and chemical characterization of active extracts

Crude extracts are a mixture of compounds that are commonly extracted due to their chemical affinity during the same separation treatment. Rusnak *et al.* (2001) reported the isolation of a mixture of aromatic compounds (similar to gentamicine) with antimicrobial activity against Gram-positive bacteria produced by different *Micromonospora* species. The biological activity observed may be the result of a synergic effect between compounds; however, it is also possible that the activity of one compound happens to be diminished by the presence of another, or that the activity can be explained by the specific effect of one compound (Challis and Hopwood 2003). Therefore, both the lack of biological activity and the broad spectrum activity observed can be explained based on chemical considerations of the crude extracts.

Bioactive compounds have been previously obtained from *Micromonospora* and *Salinispora* strains using EtOAc as solvent in the extraction method. In prior surveys the extracted compounds showed antimicrobial activity against *Candida albicans* and *Enterococcus faecium*, and cytotoxic activity against colon cancer cells (HCT-116) (Mincer *et al.* 2002, Jensen *et al.* 2007). Although the extraction method can define the type of compounds obtained (e.g., salinosporamide A was extracted using Amberlite XAD-16 resin eluted with acetone; Feling *et al.* 2003), the bacterial group used in this study has the secondary metabolite production potential to assure the recovery of bioactive compounds. Members of the family Micromonosporaceae, to which the genera *Micromonospora* and *Salinispora* belong, are characterized for being important producers of bioactive

Salinispora y *Verrucosipora* también encontrados en este estudio independientemente de la diferencia en el método de recolección y cultivo utilizados. La diferencia en las técnicas de aislamiento y cultivo de las cepas bacterianas y en las localidades muestreadas puede explicar la variación en la recuperación de ciertos géneros que existe entre el trabajo de Maldonado *et al.* (2009) y el presente estudio. Sin embargo, las técnicas selectivas de aislamiento y cultivo utilizadas en el presente estudio permitieron recuperar cepas con importante actividad biológica.

Las características ambientales de los diferentes sitios de muestreo (i.e., tipo de sedimento, distancia de la costa, profundidad) pueden explicar la distribución específica de las actinobacterias aisladas. Además, es con base en estas características que consideramos a los sitios de muestreo como representativos de los distintos ambientes que ocurren en la zona norte y zona sur del golfo de California. Por lo tanto, la diferencia en la abundancia y distribución de las cepas recuperadas en este estudio también la consideramos representativa de la diversidad de ambientes que ocurren en el golfo de California.

Se ha documentado que las actinobacterias del género *Streptomyces* son abundantes en sitios cercanos a la costa con influencia terrígena (Jensen *et al.* 1991, Takizawa *et al.* 1993, Moran *et al.* 1995). Las muestras de bahía Concepción fueron recolectadas en un ambiente somero donde el aporte de material terrígeno es abundante como consecuencia de los escurrimientos en la temporada de lluvias durante el verano y el aporte de sedimento por el viento (Rodríguez-Meza *et al.* 2009). Se ha documentado que representantes terrestres del género *Streptomyces* tienen una alta tolerancia a ambientes salinos. Bajo estas circunstancias, producen esporas resistentes que pueden ser transportadas al ambiente marino en donde permanecen latentes hasta que las condiciones ambientales favorecen su desarrollo (Jensen *et al.* 1991, Moran *et al.* 1995). La alta abundancia de cepas tipo *Streptomyces* en bahía Concepción puede deberse a su origen terrestre, así como a su capacidad de adaptación a los cambios de salinidad y otros factores fisicoquímicos del ambiente somero costero marino (Jensen *et al.* 1991, Moran *et al.* 1995).

Las cepas *Micromonospora* y *Salinispora* fueron más abundantes en sitios alejados de la costa y de mayor profundidad donde la influencia terrígena es mínima, como ocurre en bahía de los Ángeles. En diferentes estudios se ha obtenido una mayor recuperación de estos géneros en muestras de sedimento profundo (≥ 100 m) (Jensen *et al.* 1991; Maldonado *et al.* 2005a, 2009; Jensen y Mafnas 2006). Estos géneros de actinobacterias se caracterizan por tener extrema tolerancia a condiciones de alta salinidad e incluso requerir estrictamente de los iones del agua de mar para su crecimiento (Jensen *et al.* 1991, Mincer *et al.* 2002, Jensen y Mafnas 2006). Estas características hacen referencia a su adaptación para vivir tanto en ambientes costeros, donde el gradiente de salinidad puede variar ampliamente, como en

compounds with antitumor activity, such as salinosporamide A isolated from *Salinispora tropica* and the rifamycins from *Micromonospora* (Feling *et al.* 2003, Fenical and Jensen 2006, Eccleston *et al.* 2008).

The genus *Salinispora* is a clear example of the potential of actinobacteria for producing bioactive compounds. In this study we found that 90% of the bioactive extracts belong to *Salinispora* strains. This genus is a prolific source of secondary metabolites with broad structural diversity (Jensen *et al.* 2007, Udvary *et al.* 2007). Fenical and Jensen (2006) mentioned that about 80% of the strains within this genus showed antitumor activity and 35% antimicrobial activity, despite their geographic provenance. For instance, all the *S. tropica* strains produce the same two compounds: salinosporamide A and sporolide A. Moreover, all *S. arenicola* strains produce rifamycin-family compounds, staurosporine and saliketol (Jensen *et al.* 2007, Udvary *et al.* 2007). Nonetheless, in order to certainly determine which kind of compound was related to the activity observed, a complete chemical characterization of extracts was needed.

Despite the high similarity of the UV signals detected with the previously described bioactive compounds for *Bacillus brevis*, *Streptomyces* sp., and *Bauveria nivea*, it is unlikely that the compounds mentioned above are part of the crude extracts we analyzed. First, there is a great discrepancy between the genera from which these compounds have been isolated and the genera from which the bioactive strains were obtained in this study. It has been determined that lateral gene transfer (LGT) is a mechanism that allows the acquisition of biosynthetic genes responsible for producing bioactive compounds (Jensen *et al.* 2007); however, in this study we have no proof of LGT that explains the production of these compound by the actinobacteria isolated.

Since chromophore signals between compounds can be very similar with no interspecific distinction, UV analysis was useful only as a first approximation for the chemical characterization of the crude extracts. For this reason, MS analysis proved to be a better approach to identify with better resolution the variety of compounds in the crude extracts. In this case, the molecular masses corresponding to those compounds detected by UV were not identified using MS.

Species-specific secondary metabolite production within *S. arenicola* and *S. tropica* has been established and proved to be independent of the geographical site of isolation (Jensen *et al.* 2007). However, no species-specific secondary metabolite molecular weights were identified with the MS analysis that can explain the high activity values obtained for the *Salinispora* strains. This can be explained considering that the biosynthetic compound pathways may vary according to the use of different fermentation conditions. The isolation of pure compounds and use of structural elucidation techniques (i.e., nuclear magnetic resonance and X-ray crystallography) on these compounds would be necessary to confirm the hypothesis of alternative biosynthetic pathway expression. Nevertheless, the apparent absence of molecular weights of

ambientes marinos, donde los valores de salinidad tienden a ser más constantes (Jensen *et al.* 1991, Mincer *et al.* 2002). Las características ambientales de los sitios de muestreo explican la abundancia observada de estos dos grupos en bahía de los Ángeles.

Actividad biológica y caracterización química de extractos activos

Los extractos crudos son una mezcla de compuestos que son extraídos debido a su afinidad química durante el mismo tratamiento de separación. Rusnak *et al.* (2001) documentaron la extracción de una mezcla de compuestos aromáticos (similares a la gentamicina) con actividad antimicrobiana en contra de distintas cepas bacterianas Gram-positivas producidas por diferentes especies del género *Micromonospora*. La actividad biológica observada, por lo tanto, puede ser el resultado de un efecto sinérgico entre compuestos; sin embargo, también es posible que la actividad de un compuesto sea afectada por la presencia de otro, o que la actividad se deba al efecto de un compuesto en específico (Challis y Hopwood 2003). Por lo tanto, la falta de actividad y el amplio espectro de actividad observados pueden ser explicados por la naturaleza química de los extractos crudos.

La obtención de compuestos activos con AcOEt como disolvente en el método de extracción ha sido previamente registrada para cepas *Micromonospora* y *Salinispora*. En estos estudios previos los compuestos extraídos mostraron actividad antimicrobiana contra *Candida albicans* y *Enterococcus faecium*, y actividad citotóxica contra la línea celular de cáncer de colon (HCT-116) (Mincer *et al.* 2002, Jensen *et al.* 2007). La obtención de compuestos activos se encuentra definida en gran parte por el método de extracción que se utilice; por ejemplo, la salinosporamida A fue extraída con resina amberlita XAD-16 eluido con acetona (Feling *et al.* 2003). Sin embargo, el grupo bacteriano con el que se realizó el presente trabajo tiene el potencial de producir una amplia gama de metabolitos secundarios, lo que incrementa la probabilidad de la obtención de compuestos bioactivos. Los miembros de la familia Micromonosporaceae, a la que pertenecen los géneros *Micromonospora* y *Salinispora*, se caracterizan por ser importantes productores de compuestos bioactivos con actividad citotóxica, como salinosporamida A obtenido de *Salinispora tropica* y las rifamicinas obtenidas de *Micromonospora* (Feling *et al.* 2003, Fenical y Jensen 2006, Eccleston *et al.* 2008).

El género *Salinispora* es un claro ejemplo del potencial de las actinobacterias para producir compuestos bioactivos. En este estudio se encontró que el 90% de los extractos bioactivos correspondían a cepas pertenecientes al género *Salinispora*. Este género es una fuente prolífica de metabolitos secundarios con una amplia diversidad estructural (Jensen *et al.* 2007, Udvary *et al.* 2007). Fenical y Jensen (2006) mencionan que el 80% de las cepas de este género muestran actividad antitumoral y 35% actividad antimicrobiana,

characteristic and specific secondary metabolites previously reported for the genus *Salinispora* leads to novel hypotheses regarding the bioactive nature of the crude extracts obtained in this study.

The geographical isolation and oceanographic conditions of the Gulf of California may be factors determining the phylogenetic and metabolic diversity associated with secondary metabolite production by *Salinispora* strains. Becerril-Espinosa 2011 identified, based on the phylogenetic analysis of polyketide synthase genes, the presence of ketosynthase domains associated with the production of novel active compounds for *Salinispora* strains isolated from the Gulf of California; hence, the activity observed in the present study may be due to compounds not yet reported for this genus.

The results of this study clearly show that the Gulf of California is a reservoir of actinobacterial strains with potential biological activity, as well as its potential as a source of novel bioactive compounds. We would like to encourage the development of studies that assess the recovery of these bioactive microorganisms as well as new fermentation and chemical compound extraction techniques as a strategy to continue exploring new boundaries for the diverse bioactive compounds that actinobacteria produce and their biotechnological application.

ACKNOWLEDGEMENTS

The first author acknowledges receipt of a scholarship from the Mexican Council for Science and Technology (CONACYT). Thanks are due to A Licea and laboratory staff of the Biotechnology Department at CICESE (Ensenada, Mexico) for help with the cytotoxicity assays, W Gerwick and his laboratory staff at the Center for Marine Biotechnology and Biomedicine (CMBB) at Scripps Institution of Oceanography (SIO-UCSD) for the support provided during the cytotoxicity assays, the Chemistry Department of the University of Hawaii for assistance with the antimicrobial assays, and P Jensen and his laboratory staff (CMBB, SIO-UCSD) for their valuable support with the identification of the strains and chemical characterization of the extracts.

REFERENCES

- Anderson AS, Wellington EMH. 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 797–814.
- Becerril-Espinosa A. 2011. Actinobacterias aisladas del sedimento marino del Golfo de California y de Bahía Todos Santos: diversidad, bioactividad y dominios cetosintetasa. PhD thesis, Universidad Autónoma de Baja California, México, 114pp.
- Becerril-Espinosa A, Guerra-Rivas G, Ayala-Sánchez N, Soria-Mercado IE. 2012. Antitumor activity of actinobacteria isolated in marine sediment from Todos Santos Bay, Baja California, Mexico. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 47: 317–325.
- Bredholt H, Galatenko O, Engelhardt K, Fjærviik E, Terekhova L, Zotchev S. 2007. Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: Isolation, independientemente de su origen geográfico. Se ha demostrado que la mayoría de las cepas de *S. tropica* producen los mismos dos compuestos, salinosporamida A y sporolida A, así como la mayoría de las cepas de *S. arenicola* producen compuestos de la familia de la rifamicina, estaurosporina y salicetal (Jensen *et al.* 2007, Udvary *et al.* 2007). Sin embargo, para identificar el tipo de compuestos relacionado con la actividad observada, se realizó la caracterización química inicial de los extractos obtenidos.
- A pesar del alto porcentaje de similitud entre las señales UV obtenidas con los compuestos antibióticos y antitumorales descritos previamente para *Bacillus brevis*, *Streptomyces* sp. y *Bauveria nivea*, consideramos que éstos pueden no ser parte de los extractos crudos analizados. Esto, principalmente, se debe a la diferencia entre los géneros a partir de los cuales éstos compuestos fueron aislados originalmente y los géneros de los que fueron extraídos en este estudio. Se ha comprobado que la transferencia lateral de genes es un mecanismo que permite la adquisición de genes biosintéticos responsables de la producción de compuestos activos (Jensen *et al.* 2007). Sin embargo, en este estudio no existe prueba de este tipo intercambio génico que explique la producción de estos compuestos por los géneros de actinobacterias aislados.
- Las señales de los cromóforos pueden ser muy similares entre compuestos sin distinción interespecífica. En este caso, el análisis espectrométrico de UV sólo fue útil como aproximación inicial al tipo de compuestos presentes en los extractos. Por esta razón, el análisis de masas resultó una mejor aproximación para identificar con mayor resolución la variedad de compuestos presentes en los extractos crudos. En este caso los pesos moleculares correspondientes a los compuestos identificados por UV no fueron detectados en el análisis de masas.
- La producción de metabolitos secundarios específicos para *S. arenicola* y *S. tropica* ha sido comprobada independientemente de la diferencia geográfica de los sitios de aislamiento de las cepas de estas especies (Jensen *et al.* 2007). Sin embargo, los pesos moleculares de estos metabolitos no fueron identificados con el análisis de masas para poder explicar los altos valores de actividad biológica observados para estas cepas. Probablemente esto puede deberse a la variación de las rutas biosintéticas de los compuestos como consecuencia del uso de diferentes condiciones de cultivo (medios de cultivo). La purificación de los extractos crudos y el uso de técnicas para la elucidación estructural de éstos (i.e., resonancia magnética nuclear y cristalografía de rayos X) serían necesarios para confirmar la hipótesis de la expresión de rutas biosintéticas alternas. Sin embargo, la aparente ausencia de los pesos moleculares de compuestos característicos y específicos previamente registrados para el género *Salinispora* permite hacer el planteamiento de nuevas hipótesis relacionadas con la naturaleza bioactiva de los extractos obtenidos en este estudio.
- El aislamiento geográfico y las condiciones oceanográficas del golfo de California pueden ser factores que

- diversity and biological activity. *Environ. Microbiol.* 9: 2756–2764.
- Bredholt H, Fjaervik E, Johnsen G, Zotchev SB. 2008. Actinomycetes from sediments in the Trondheim fjord, Norway: Diversity and biological activity. *Mar. Drugs* 6: 12–24.
- Bull AT, Stach JEM, Ward AC, Goodfellow M. 2005. Marine actinobacteria: Perspectives, challenges, future directions. *Antonie Van Leeuwenhoek* 87: 65–79.
- Canino-Herrera SR, Gaxiola-Castro G, Segovia-Zavala JA. 1990. Efecto de procesos físicos sobre la variación de clorofila, seston y productividad primaria en la ensenada norte de bahía de los Angeles (verano 1986). *Cienc. Mar.* 16(2): 67–85.
- Challis GL, Hopwood DA. 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *PNAS* 100: 14555–14561.
- Charan RD, Schlingmann G, Janso J, Bernan V, Feng X, Carter GT. 2004. Diazepinomicin, a new antimicrobial alkaloid from a marine *Micromonospora* sp. *J. Nat. Prod.* 67: 1431–1433.
- Davies J. 2006. Are antibiotics naturally antibiotics? *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33: 496–499.
- Eccleston G, Brooks P, Kurtboke I. 2008. The occurrence of bioactive Micromonosporae in aquatic habitats of the sunshine coast in Australia. *Mar. Drugs* 6: 243–261.
- Ensign JC. 1978. Formation, properties, and germination of actinomycete spores. *Ann. Rev. Microbiol.* 32: 185–219.
- Feling RH, Buchanan GO, Mincer TJ, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W. 2003. Salinosporamide A: A highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinispora*. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42: 355–357.
- Fenical W, Jensen PR. 2006. Developing a new resource for drug discovery: Marine actinomycete bacteria. *Nat. Chem. Biol.* 2: 666–673.
- Fenical W, Jensen PR, Palladino MA, Lam KS, Lloyd GK, Potts BC. 2009. Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). *Bioorgan. Med. Chem.* 17: 2175–2180.
- Gontang EA, Fenical W, Jensen PR. 2007. Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 3272–3282.
- Jensen PR. 2010. Linking species concepts to natural product discovery in the post-genomic era. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37: 219–224.
- Jensen PR, Mafnas C. 2006. Biogeography of the marine actinomycete *Salinispora*. *Environ. Microbiol.* 8: 1881–1888.
- Jensen PR, Dwight R, Fenical W. 1991. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1102–1108.
- Jensen PR, Williams P, Dong-Chan O, Zeigler L, Fenical W. 2007. Species-specific secondary metabolite production in marine actinomycetes of the genus *Salinispora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 1146–1152.
- Kwon HC, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W. 2006. Marinomycins A–D, antitumor-antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus *Marinispora*. *J. Am. Chem. Soc.* 128: 1622–1632.
- Lo CW, Lai NS, Cheah HY, Wong NKI, Ho CC. 2002. Asian review of biodiversity and environmental conservation. [Http://www.arbc.com.my/pdf/art21julysep02.pdf](http://www.arbc.com.my/pdf/art21julysep02.pdf).
- Magarvey NA, Keller JM, Bernan V, Dworkin M. 2004. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 7520–7529.
- determinan la diversidad filogenética y metabólica asociada con la producción de metabolitos secundarios para las cepas del género *Salinispora*. Becerril-Espinosa 2011 identificaron, con base en el análisis filogenético de los genes policétido sintasa, la presencia de dominios cetosintasa asociados con la producción de nuevos compuestos activos para cepas del género *Salinispora* aisladas del golfo de California. Por lo tanto, la actividad observada en este estudio se puede deber a compuestos no registrados previamente para este género de actinobacteria.
- Los resultados de este estudio demuestran que el golfo de California es una fuente potencial de cepas de actinobacterias productoras de compuestos con actividad biológica importante para la salud humana en la actualidad, además de su potencial como fuente de posibles nuevos compuestos bioactivos. Consideramos necesario el desarrollo de nuevas técnicas de cultivo y extracción de compuestos químicos, así como el desarrollo de estudios que describan el potencial de nuevos sitios para la recuperación de este tipo de microorganismos para continuar explorando las fronteras de la diversidad de compuestos activos que producen las actinobacterias y su aplicación biotecnológica.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Se agradece a A Licea y a los miembros de su laboratorio en el Departamento de Biotecnología en CICESE (Ensenada, México) por su asistencia en la realización de los ensayos de actividad citotóxica, a W Gerwick y a los miembros de su laboratorio en el Centro para la Biotecnología Marina y Biomedicina (CBMB) del Instituto de Oceanografía Scripps de la Universidad de California en San Diego (SIO-UCSD), al Departamento de química de la Universidad de Hawaii por su apoyo en la realización de los ensayos de actividad citotóxica y antibiótica, y a P Jensen y miembros de su laboratorio (CBMB, SIO-UCSD) por su apoyo en la identificación genética de las cepas de actinobacterias y la caracterización química de los extractos.

- Maier R, Pepper I, Gerba C. 2000. *Environmental Microbiology*. Academic Press, 585 pp.
- Maldonado L, Fenical W, Jensen PR, Kauffman C, Mincer T, A Ward A, Bull, Goodfellow M. 2005a. *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae*. *Int J Syst Evol Micr.* 55: 1759–1766.
- Maldonado L, Stach J, Pathom-aree W, Ward A, Bull A, Goodfellow M. 2005b. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie Van Leeuwenhoek* 87: 11–18.
- Maldonado L, Fragoso-Yáñez D, Pérez-García A, Rosellón-Druker J, Quintana E. 2009. Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico. *Antonie Van Leeuwenhoek* 95: 111–120.

- Millán-Aguiñaga N, Soria-Mercado IE, Williams P. 2010. Xestosaprol D and E from the Indonesian marine sponge *Xestospongia* sp. *Tetrahedron Lett.* 51: 751–753.
- Mincer TJ, PR Jensen, Kauffman CA, Fenical W. 2002. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5005–5011.
- Moran M, Rutherford L, Hodson R. 1995. Evidence for indigenous *Streptomyces* populations in a marine environment determined with a 16S rRNA probe. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3695–3700.
- Prieto-Davó A, Fenical W, Jensen PR. 2008. Comparative actinomycete diversity in marine sediments. *Aquat. Microb. Ecol.* 52: 1–11.
- Rodríguez-Meza G, Shumilin E, Sapozhnikov D, Méndez-Rodríguez L, Acosta-Vargas B. 2009. Evaluación geoquímica de elementos mayoritarios y oligoelementos en los sedimentos de Bahía Concepción (BCS, México). *Bol. Soc. Geol. Mex.* 61: 57–72.
- Rusnak K, Troyanovich J, Mierzwa R, Chu M, Patel M, Weistein M. 2001. An antibiotic with activity against Gram-positive bacteria from the gentamicin-producing strain of *Micromonospora purpurea*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 502–503.
- Sujatha P, Bapi Raju KVVS, Ramana T. 2005. Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Res.* 160: 119–126.
- Surajit-Das P, Lyla S, Ajmal-Khan S. 2006. Marine microbial diversity and ecology: Importance and future perspectives. *Curr. Sci.* Vol. 98: 1325–1335.
- Takizawa M, Colwell R, Hill R. 1993. Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 997–1002.
- Udwary D, Zeigler L, Asolkar R, Singan V, Lapidus A, Fenical W, Jensen PR, Moore B. 2007. Genome sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete *Salinispora tropica*. *PNAS* 104: 10376–10381.
- Vernam A, Evans M. 2000. *Environmental Microbiology*. ASM Press, Washington DC, 160pp.
- Villarreal-Gómez LJ, Soria-Mercado IE, Guerra-Rivas G, Ayala-Sánchez NE. 2010. Antibacterial and anticancer activity of seaweeds and bacteria associated with their surface. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 45: 267–275.
- Ward AC, Bora N. 2006. Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 9: 279–286.

Received March 2012,
received in revised form August 2012,
accepted August 2012.