



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA SUR

ÁREA DE CONOCIMIENTOS DE CIENCIAS DEL MAR

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA MARINA

TESIS

**IDENTIFICACIÓN Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE BACTERIAS
CULTIVABLES ASOCIADAS A LA ESPONJA *Mycale* sp. DE LA BAHÍA DE
LA PAZ, B.C.S., MÉXICO.**

QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO MARINO

PRESENTA:

YESSICA PARERA VALADEZ

DIRECTOR:

DRA. CLAUDIA JUDITH HERNÁNDEZ GUERRERO

LA PAZ, BAJA CALIFORNIA SUR, OCTUBRE DE 2012

La presente tesis titulada "IDENTIFICACIÓN Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE BACTERIAS CULTIVABLES ASOCIADAS A LA ESPONJA *Mycale* sp. DE LA BAHÍA DE LA PAZ, B.C.S., MÉXICO." se realizó en el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN) bajo la dirección de la Dra. Claudia Judith Hernández Guerrero, dentro de los proyectos "Búsqueda de actividad antimicrobiana en bacterias heterótrofas asociadas a la esponja *Haliclona* sp. de la Bahía de la Paz, B.C.S., México" SIP 20111046 e "Identificación molecular y actividad antibacteriana de bacterias heterótrofas aisladas de la esponja *Mycale* sp." SIP 20121262.

DEDICATORIA

A mis padres

Ing. Enrique Parera Guasco y Aurora Valdez,

gracias por su apoyo incondicional e infinita confianza,
gracias por amarme tanto!

A José Rodrigo Torres Bermúdez,

gracias por formar parte de mi vida.

A mis queridas “machorritas”,

por estar siempre para mí, por ser entusiastas y por siempre
tener una sonrisa para regalarme.

A familiares y amigos, en fin... a todos los que siempre han
creído en mí.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Interdisciplinario en Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN) por permitirme el uso de las instalaciones y material utilizado en la realización de este trabajo.

Un agradecimiento especial a mi directora Dra. Claudia Judith Hernández Guerrero, por ser tan paciente, por ayudarme en todo momento y por su apoyo en la realización de este proyecto.

A mis asesores Dra. Bárbara González Acosta y Dr. Carlos Sánchez Ortiz por las aportaciones realizadas a este trabajo y sus sabios consejos.

A la Hermandad de los Productos Naturales: M. en C. Ruth Noemí Aguila, Francisco Vargas, Ismael Ortiz, Cynthia Montes, Sonia Valencia, Dra. Karla León y Erika Presa por su ayuda en todo momento, comentarios, apoyo moral y las tardes de Wii.

ÍNDICE

RELACIÓN DE FIGURAS	I
RELACIÓN DE TABLAS	II
GLOSARIO.....	III
ABREVIATURAS.....	VI
RESUMEN	VII
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
JUSTIFICACIÓN	10
IDENTIFICACIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA.....	11
OBJETIVO GENERAL	11
OBJETIVOS PARTICULARES.....	12
MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
Área de estudio.....	12
Recolección de muestras.....	13
Identificación taxonómica de <i>Mycale</i> sp.....	14
Trabajo en Laboratorio.....	16
Aislamiento de ADN.....	17
Amplificación de ADN mediante PCR.....	18
Secuenciación y análisis genético.....	19
Ensayo de actividad antibacteriana.....	20

RESULTADOS.....	22
Aislamiento de bacterias cultivables asociadas a <i>Mycale</i> sp.	22
Identificación molecular de las bacterias cultivables asociadas a la esponja <i>Mycale</i> sp.....	24
Actividad antibacteriana frente a cepas de bacterias patógenas	30
 DISCUSION	 32
Aislamiento de bacterias cultivables asociadas a <i>Mycale</i> sp.	32
Identificación molecular de las bacterias cultivables asociadas a la esponja <i>Mycale</i> sp.....	35
Actividad antibacteriana frente a cepas de bacterias patógenas	40
 CONCLUSIONES.....	 45
 BIBLIOGRAFÍA	 47
 ANEXO I Secuencias parciales del ADNr 16S	 64

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación del área de estudio. Tomado de Vázquez <i>et al.</i> , 2011.....	13
Figura 2. <i>Mycale</i> sp. Fotografía: Carlos Sánchez.....	15
Figura 3. Número de cepas Gram positivas y Gram negativas morfológicamente diferentes aisladas a partir de la esponja <i>Mycale</i> sp.	22
Figura 4. Productos de PCR correspondiente al ADNr 16S de las bacterias aisladas de la esponja <i>Mycale</i> sp.....	24
Figura 5. Porcentaje de bacterias correspondientes a los diferentes Fila.	26
Figura 6. Representación porcentual de los diferentes géneros de bacterias aisladas de la esponja <i>Mycale</i> sp.....	28
Figura 7. Especies de bacterias aisladas de la esponja <i>Mycale</i> sp.....	28
Figura 8. Árbol bayesiano obtenido a partir de la secuencias parciales del ADNr 16S de cepas cultivables asociadas a <i>Mycale</i> sp.....	29
Figura 9. Ejemplos de halos de inhibición de las bacterias asociadas a la esponja <i>Mycale</i> sp. frente a las cepas <i>S. aureus</i> (a y b), <i>E. coli</i> (c) y <i>V. carcharie</i> (d).....	31

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla I. Morfología colonial y microscópica de las bacterias cultivables aisladas de la esponja <i>Mycale</i> sp.	23
Tabla II. Comparación de las bacterias asociadas a la esponja <i>Mycale</i> sp. con secuencias reportadas en el NCBI.	25
Tabla III. Condensado sobre la posición taxonómica de cada una de las secuencias de las cepas aisladas de la esponja <i>Mycale</i> sp.	26
Tabla IV. Cepas con actividad antimicrobiana positiva aisladas de la esponja <i>Mycale</i> sp. Valores promedio (mm) del halo de inhibición \pm desviación estándar.....	31

GLOSARIO

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

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

Antibacteriano: fármaco o sustancia capaz de inhibir el crecimiento y desarrollo de bacterias o su eliminación sin dañar al organismo infectado.

Cadenas de Markov Monte Carlo: método numérico que permite aproximar la probabilidad posterior de un árbol (o de cualquier otra hipótesis compleja) basándose en el muestreo de una distribución simulada en lugar de calcular dicha distribución mediante integración.

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

Crateriforme: con forma de cráter.

Diluciones decimales o seriadas: procedimiento para la determinación de células viables usando diluciones seriadas de la muestra y el método de extensión en placa, esto es, colocando un volumen definido de la

dilución que se extiende sobre la superficie de una placa con medio de cultivo sólido.

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

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

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

Inferencia bayesiana: se basa la interrelación cuantitativa entre la función de verosimilitud y las distribuciones anteriores y posteriores de probabilidad.

Mesohilo: matriz gelatinosa compuesta por fibras de soporte, espículas del esqueleto y una variedad de células ameboides que cumplen funciones vitales del organismo.

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

Pulvinado: con forma de cojín o almohada.

Secuenciación: conjunto de métodos y técnicas bioquímicas para determinar el orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un oligonucleótido de ADN.

Siembra en estría: Método de siembra utilizado en microbiología que permite obtener colonias aisladas.

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

Tinción de Gram: procedimiento de tinción diferencial empleado para la visualización de bacterias. Dicha técnica permite diferenciar los dos grandes grupos bacterianos: las bacterias Gram-positivas y las Gram-negativas; se basa en las diferencias que existen en la composición molecular de las paredes de ambos grupos de bacterias.

Umbonado: con umbón o prominencia mamiliforme en el centro.

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucléico
ADNr	ácido desoxirribonucléico ribosomal
ARN	ácido ribonucléico
Buffer TE	Buffer Tris-EDTA
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DNTP's	desoxirribonucleótido trifosfato
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
H ₂ O	agua
LB	colorante de carga (del inglés loading buffer)
NaCl	cloruro de sodio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
rmp	revoluciones por minuto
ARNsa	ribonucleasa
SDS	dodecilsulfato sódico
TBE	solución amortiguadora tris-ácido bórico-EDTA
TE	tris EDTA
TSA	agar soya tripticasa
UFC	unidades formadoras de colonias
V	volts

RESUMEN

Las esponjas son un recurso prometedor para el aislamiento de nuevas sustancias activas que puedan contrarrestar la creciente resistencia adquirida por los diferentes agentes patógenos. Dentro de la asociación esponja-bacteria, con respecto a la producción de metabolitos, aún no es evidente si las bacterias asociadas son las verdaderas productoras de dichos compuestos naturales. Existe evidencia que respalda la producción de metabolitos por parte de los microorganismos asociados a las esponjas marinas, como es el caso de algunas bacterias simbiontes de esponjas del género *Mycale*, de las cuales se han logrado identificar compuestos antitumorales y antibacteriales. En el presente estudio se lograron aislar un total de 37 cepas de bacterias asociadas a la esponja *Mycale* sp. recolectada en la localidad La Bruja, dentro de la Bahía de La Paz. En su mayoría se caracterizaron por ser Gram positivas y presentar morfología tipo bacilo. La identificación taxonómica mediante la secuenciación del ADNr 16S indicó que la mayoría de estas cepas corresponden al filo Proteobacteria (40%), seguidas de Firmicutes (38%) y Actinobacteria (22%), con una predominancia de las clases Bacilli y α -proteobacteria. El 49% de las cepas presentó actividad antibacteriana al menos frente a una de las cepas patógenas probadas, siendo más sensibles las cepas de *Staphylococcus aureus* con halos de inhibición entre 13 y 15 mm, *Escherichia coli* con halos entre 10 y 17 mm y *Vibrio carchariae* con halos entre 12 y 18 mm. Resulta interesante continuar con los estudios de las cepas bioactivas para poder identificar a los compuestos responsables de dicha actividad.

Palabras clave: Esponjas, *Mycale*, bacterias asociadas, actividad antibacteriana.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la búsqueda de nuevos compuestos que puedan ser utilizados con fines farmacológicos se ha incrementado considerablemente. Este interés se debe a las diversas enfermedades para las que no hay medicamentos efectivos, la resistencia de agentes patógenos y los avances en el área de la biología molecular que han propiciado un mayor descubrimiento de moléculas “blanco” (Garateix, 2005). Dentro de los productos naturales marinos, las esponjas son los recursos más prometedores en el aislamiento de nuevas sustancias para el desarrollo de fármacos (Blunt *et al.*, 2003). Por otra parte, las esponjas contienen una gran cantidad de microorganismos asociados en íntima relación simbiótica, que puede llegar a representar hasta 60% del total de la biomasa de la esponja (Lee *et al.*, 2001). Se ha postulado que son las bacterias asociadas las responsables de la actividad que presentan las esponjas (Unson *et al.*, 1994).

A partir de las esponjas del género *Mycale*, se han aislado interesantes compuestos del tipo de los terpenos, saponinas, nucleósidos, policétidos nitrogenados y macrólidos, algunos de los cuales han demostrado poseer una amplia gama de bioactividades (Capon *et al.*, 1997; Matsunaga *et al.*, 1999). En cuanto a estudios de bacterias asociadas a este género son pocos los trabajos realizados (Lee *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008), y en determinados casos se han aislado compuestos a partir de algunos microorganismos simbioses (Doshida *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2005; Xin *et al.*, 2005; Xin *et al.*, 2007).

Las bacterias son microorganismos con una amplia gama de metabolismos, característica que les confiere una enorme capacidad de adaptación y que permite a su vez la colonización de casi cualquier ambiente. Está es una de las causas por la que las investigaciones en productos naturales marinos han enfocado sus esfuerzos a obtener compuestos de estos procariontes debido a las ventajas que esto conlleva; su alta tasa de crecimiento poblacional permitiría tener un abastecimiento constante del compuesto, además de que incluso sería posible modificar el organismo genéticamente para mejorar la producción, incrementando aún más la rentabilidad en la industria farmacéutica (Hentschel *et al.*, 2001; Remya *et al.*, 2010).

En este contexto, la presente tesis pretende aportar información acerca de la comunidad bacteriana cultivable asociada a la esponja *Mycale* sp. recolectada en la localidad de La Bruja dentro de la Bahía de La Paz, y su posible actividad antibacteriana. Esto con el fin de aportar información que contribuya en la búsqueda de cepas con potencial bioactivo.

ANTECEDENTES

Las esponjas a lo largo de su evolución han desarrollado un arsenal de poderosas armas químicas que utilizan como un mecanismo de defensa y protección. Estos compuestos químicos se conocen como metabolitos secundarios y tienen un gran interés en la industria farmacéutica debido a que muchos de ellos presentan interesantes actividades citotóxicas, antivirales, antitumorales y antibióticas (Blunt *et al.*, 2003).

Sin embargo, en los últimos años, se ha intensificado el estudio de los microorganismos asociados a las esponjas puesto que éstas, al ser organismos filtradores, entran en contacto con un sin número de microorganismos que pueden colonizar sus tejidos, ya sea por medio de relaciones simbióticas mutualistas o comensales. De hecho, se estima que estos microorganismos pueden representar entre el 40 y 60% de la biomasa total de la esponja. Las bacterias son las colonizadoras mayoritarias, constituyendo una densidad de 10^8 hasta 10^{10} bacterias gramo^{-1} de peso húmedo (Meyer & Kuever, 2007), incluso un conteo total de bacterias presentes en el tejido de una esponja puede superar de uno a tres órdenes de magnitud un conteo total de bacterias presentes en una muestra de agua marina (Friedrich *et al.*, 2001; Webster & Hill, 2001). Por lo general, la comunidad bacteriana asociada a las esponjas consiste de al menos trece Fila: Proteobacteria, Actinobacteria, Nitrospira, Cyanobacteria, Bacteroidetes, Deinococcus-Thermus, Spirochaetes, Chloroflexi, Planctomycetes, Acidobacteria,

Firmicutes, Poribacteria y Verrucomicrobia, además de que cuenta con miembros del dominio Arquea (Taylor *et al.*, 2007; Remya *et al.*, 2010). De todos estos grupos destacan las Actinobacteria y las Proteobacterias como los Filas de los que se han aislado el mayor número de productos naturales (Santos *et al.*, 2010).

La manera en que las esponjas adquieren estos simbiontes aún no es muy clara, pero existen dos posibilidades: por medio de la filtración del agua de su medio ambiente, o bien por medio de la transmisión directa a las larvas (Hill, 2004; Enticknap *et al.*, 2006).

Los microorganismos asociados a las esponjas pueden estar presentes como simbiontes extracelulares, sobre la superficie de la misma como exosimbiontes, o dentro del mesohilo como endosimbiontes, incluso, si se encuentran dentro de las células de la esponja, se denominan simbiontes intracelulares o, en el caso del núcleo, intranucleares (Hill, 2004). Aunque es bien sabido que los microorganismos asociados a las esponjas son de vital importancia para la biología de las mismas, poco se sabe acerca de las verdaderas tareas que desempeñan. Estudios anteriores han sugerido varios beneficios que la esponja obtiene de estos peculiares simbiontes como es la nutrición por medio de la incorporación directa de la materia orgánica disuelta en el agua, la fijación de nitrógeno y nitrificación gracias a las cianobacterias simbiontes (Wilkinson & Fay, 1979), transporte de metabolitos, contribución a la estabilidad de la estructura de la esponja (rigidez), asistencia en defensas químicas contra depredadores y

organismos incrustantes (Althoff *et al.*, 1998), protección contra rayos UV (Sara, 1971), e incluso remoción de productos de desecho.

Uno de los aspectos que aún no se encuentra muy claro con respecto a la producción de metabolitos en las esponjas es el que involucra al verdadero sintetizador de los productos naturales. Muchas veces se ha asumido que los microorganismos simbiotes son los responsables, pero para hacer una aseveración como esa es necesario tomar en cuenta algunos factores: 1) que su estructura química sea idéntica o similar a la del metabolito producido por otro microorganismo de vida libre; 2) encontrarse en esponjas de grupos taxonómicos diferentes y 3) encontrarse tanto en la esponja como en otro invertebrado que no se alimente de la misma (Unson *et al.*, 1994). Si bien existe evidencia, aunque poca, la que respalda la producción de metabolitos por parte de los microorganismos asociados (Stierle *et al.*, 1988; Elyakov *et al.*, 1991; Unson & Faulkner, 1993; Debitus *et al.*, 1998), ya sea que cooperen con el sistema de defensa de su hospedero (Althoff, 1998) o que simplemente éste último almacene un compuesto producido por el microorganismo del cual se alimenta (Faulkner *et al.*, 1994).

Los primeros estudios que tomaron en cuenta la importancia del papel que tenían las bacterias en las esponjas fueron realizados gracias al avance de la microscopía electrónica. A partir de 1939 se demostró la presencia de bacterias en esponjas marinas (Dosse, 1939; Levi & Levi, 1965), sin embargo, muchos autores consideran que la verdadera investigación comenzó hace cuatro décadas gracias

al trabajo de Vacelet (1970), en el cual se realizó una descripción de las bacterias asociadas a las células de la esponja *Verongia*. En los años siguientes el mismo Vacelet y colaboradores continuaron con la investigación de estos simbioses, planteando que se trataba principalmente de bacterias heterotróficas y cianobacterias (Vacelet 1971, 1975; Vacelet & Donadey 1977).

Otro de los considerados pioneros en el campo de estudio de la microbiología de esponjas es Wilkinson, quien realizó numerosos trabajos con respecto a la ecología y fisiología de las esponjas y sus poblaciones microbianas, además de elaborar comparaciones entre los microorganismos del agua marina y aquellos que posee la esponja en sus tejidos, encontrando que se trataba de poblaciones particularmente diferentes y concluyendo que, en efecto, las esponjas poseen microorganismos específicamente asociados a ellas en relaciones simbióticas muy estrechas (Wilkinson, 1978a, 1978b, 1978c; Wilkinson & Fay, 1979; Wilkinson & Garrone, 1980; Wilkinson *et al.* 1981).

Después de realizar varios trabajos con microscopía electrónica, los autores anteriormente mencionados llegaron a la conclusión de que existen tres tipos de poblaciones de microorganismos asociados a las esponjas: a) abundantes poblaciones de microorganismos específicos dentro del mesohilo de la esponja, b) pequeñas poblaciones de bacterias localizadas en el interior de las células de la esponja y c) poblaciones de bacterias no específicas de la esponja, similares a las que se encuentran en el agua circundante.

Wilkinson *et al.* (1981), realizaron comparaciones entre las bacterias simbiontes de distintas especies de esponjas provenientes del Mar Mediterráneo y la Gran Barrera de Coral en Australia, donde las similitudes encontradas entre estas poblaciones coadyuvaron a la conclusión de un posible ancestro común entre dichas poblaciones. Los autores plantearon que se trataba de relaciones mutualistas obligadas, las cuales pudieron haber surgido incluso antes del período de radiación de dichos invertebrados.

Años antes de la implementación de técnicas genéticas, el estudio de las comunidades bacterianas asociadas a esponjas marinas se apoyaba únicamente en el uso de la descripción morfológica gracias al uso de microscopios de transmisión electrónica y a la innovación en métodos y medios de cultivo. La adición de tejido de la misma esponja a los medios de cultivo permitió aislar cepas nuevas (Imhoff & Trüper, 1976; Wilkinson *et al.*, 1981), mientras que los ensayos de actividad antimicrobiana de difusión en agar con discos y la elaboración de extractos con solventes orgánicos, entre otros métodos, permitieron conocer un poco del enorme potencial bioquímico que representan los microorganismos asociados a las esponjas. Por desgracia, estos métodos no toman en cuenta que las bacterias son, en específico, un grupo de microorganismos difícilmente distinguible por sus características morfológicas, además de que únicamente el 1% de la población total presente en una esponja es cultivable.

A pesar de los grandes esfuerzos que se han realizado para innovar las técnicas y medios de cultivo que permitan aislar un mayor número de bacterias

asociadas a las esponjas marinas, poco se ha logrado avanzar con respecto a la diversidad de sus poblaciones. En años recientes, gracias a los adelantos tecnológicos, ha sido posible el uso de técnicas genéticas y moleculares en la investigación de la estructura de las comunidades bacterianas que habitan la esponja, así como sus posibles requerimientos nutricionales, el nicho que ocupa dentro de la esponja y las relaciones filogenéticas que existen entre dichas comunidades (Distel *et al.*, 2001). Los primeros análisis del 16S ARNr fueron realizados a finales de la década de los 90's. Althoff *et al.* (1998) analizaron muestras de la esponja *Halichondria panicea*, encontrando la presencia dominante de la bacterias pertenecientes al género *Rhodobacter*; posteriormente López *et al.* (1999), encontraron especies no descritas anteriormente asociadas a la esponja *Discodermia*, como evidencia prometedora para revelar la gran diversidad de microorganismos que habitan en estos peculiares invertebrados marinos.

Posteriormente el uso de otros métodos moleculares como la Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH) o la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE), entre otras, han sido de gran ayuda en el descubrimiento de nuevas especies de bacterias asociadas, tal es el caso del trabajo de Webster *et al.* (2001), quienes utilizaron la técnica de FISH y encontraron una gran diversidad dentro de la comunidad bacteriana asociada a la esponja *Rhopaloeides odorabile*, además de que a partir de la información obtenida modificaron diferentes medios de cultivo para aumentar el número de cepas cultivables de dicha esponja, lo que permitió aislar un mayor número de

bacterias no reportadas anteriormente, siendo la mayoría pertenecientes al grupo de los actinomicetos.

Las técnicas moleculares no sólo han revelado la gran diversidad de microorganismos que se encuentran asociados a las esponjas, sino que también han permitido avances en estudios sobre las poblaciones bacterianas de dichos invertebrados. Hentschel *et al.* (2002) mediante el uso de técnicas genéticas, encontraron una comunidad microbiana uniforme entre tres esponjas de océanos y taxa diferentes, inclusive muy distinta a la presente en el agua marina y sedimento circundante.

En lo que respecta a las esponjas del género *Mycale*, las comunidades bacterianas asociadas han sido poco estudiadas, a pesar de ello, diversos grupos cultivables han sido reportados: Bacteroidetes, Acidobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Chloroflexi; de los cuales el grupo de las Proteobacterias incluyendo todas sus divisiones son quienes han exhibido una mayor dominancia en las comunidades bacterianas (Lee *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008).

A partir de algunos microorganismos simbioses del género *Mycale*, se han aislado algunos compuestos, como el agente antibacteriano exophilina A obtenido a partir del hongo *Exophiala pisciphila* NI10102, aislado de la esponja *Mycale adhaerens* (Doshida *et al.*, 1996). La undecilprodigiosina aislada a partir de una actinobacteria de la especie *Mycale plumose* que habita las costas de China (Liu *et al.*, 2005). En la misma área geográfica, otro organismo de la misma especie, presentó un hongo asociado denominado *Penicillium auratiogriseum*, del cual fue

posible aislar dos compuestos con una alta actividad antitumoral conocidos como (S)-2,4-dihidroxi-1-butil-(4-hidroxi) benzoato y la fructigenina A (Xin *et al.*, 2005). Además, dos nuevos alcaloides aurantiomida B y C, fueron aislados del hongo *Penicillium auratiogriseum* asociado a la esponja *Mycale plumose* (Xin *et al.*, 2007).

A pesar de que se cuenta con poca información acerca de la bioactividad que puedan poseer las bacterias asociadas a las esponjas del género *Mycale*, los grupos registrados coinciden con los reportados en otras esponjas marinas, de las cuales si se han podido realizar ensayos de bioactividad, en específico de actividad antibacteriana, tal es el caso de las α y γ -Proteobacterias, Firmicutes, y Actinobacteria, las cuales han demostrado tener amplia capacidad bacteriolítica (Albrechts, 2006; Muscholl-Silberhorn *et al.*, 2007).

JUSTIFICACIÓN

De los pocos estudios realizados para identificar microorganismos asociados a esponjas del género *Mycale*, se puede rescatar que se han observado algunos que presentan compuestos con interesante actividad antibacteriana. En particular el género *Mycale* se encuentra de manera abundante en la Bahía de la Paz y dado que nada se conoce acerca de las bacterias asociadas y la actividad biológica que presentan, resulta importante realizar estudios que contribuyan a conocer la diversidad de microorganismos y su posible potencial como fuente de compuestos naturales bioactivos, por lo que en el presente trabajo se aislaron e identificaron

las bacterias asociadas a *Mycale* sp. así como su actividad antibacteriana frente a bacterias patógenas.

IDENTIFICACIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

La resistencia a antibióticos se ha convertido en problema global y de sumo interés para las autoridades de salud pública. El uso desmedido de antibióticos durante los últimos 50 años ha favorecido a la selección de cepas resistentes y difíciles de combatir (McMichael, 2000), por lo que la investigación enfocada a descubrir nuevos antibióticos ha ganado una buena posición.

En años recientes la industria farmacéutica ha apostado por los productos naturales de origen marino debido a que representan una alternativa prometedora para la elaboración de nuevos fármacos. En años recientes se ha documentado la gran diversidad de microorganismos que se encuentran asociados con las esponjas marinas y su amplio potencial biotecnológico. Por lo que resulta interesante estudiar a la esponja *Mycale* sp. de la Bahía de La Paz, B.C.S., con la finalidad de aislar nuevas cepas bacterianas que presenten actividad antibacteriana frente a cepas patógenas.

OBJETIVO GENERAL

Aislar, identificar y evaluar la actividad antibacteriana de las bacterias heterótrofas cultivables asociadas a la esponja *Mycale* sp. de la bahía de La Paz, B.C.S., México.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar las cepas asociadas a la esponja *Mycale* sp.
2. Identificar molecularmente las bacterias heterótrofas cultivables asociadas a la esponja *Mycale* sp.
3. Evaluar la actividad antibacteriana de las cepas aisladas frente a cepas patógenas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Área de estudio

La Bahía de la Paz se encuentra en la región suroeste del Golfo de California y posee una extensión aproximada de 2000 km². Posee fondos de arena y fragmentos de carbonato de calcio (Contreras, 1985). Las temperatura mínima es de 18.8° C en diciembre y la máxima de 32° C en julio (Espinoza *et al.*, 1979), presenta valores de oxígeno disuelto entre 2.73 mL L⁻¹ y 7.3 mL L⁻¹, la salinidad supera los 35 ups por el poco aporte de agua dulce y las altas tasas de evaporación (Espinoza *et al.*, 1979; Villaseñor, 1979), mientras que el régimen de mareas es mixto-semidiurno (Obeso *et al.*, 1993). En particular, la localidad La Bruja se caracteriza por presentar una profundidad entre 90 cm hasta 8 m, constituida en la zona adyacente a la costa por comunidades alternadas de macroalgas, diversas especies de esponjas (principalmente los género *Haliclona* e

Ircinia), parches de coral (*Porites* y *Pocillopora*) así como otros invertebrados y peces. Mientras que las zonas profundas (4 a 8 m), se caracterizan por ser un sustrato arenoso con presencia de pocos parches de coral (*Pocillopora*), pasto marino y esponjas del género *Mycale* (Ortiz-Aguirre com.pers.).

Recolección de muestras

La recolección de los ejemplares se realizó en la localidad La Bruja (24° 14'39" N y 110° 19'53") dentro de la Bahía de La Paz (Fig. 1).

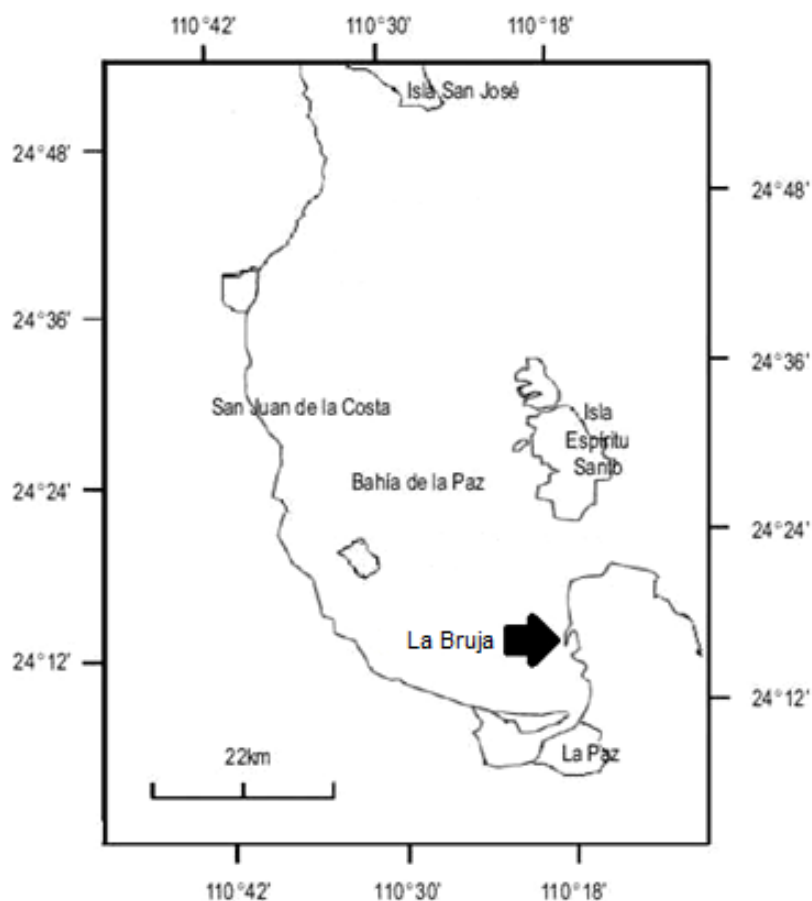


Figura 1. Ubicación del área de estudio. Tomado de Vázquez *et al.*, 2011.

Se recolectaron manualmente cinco ejemplares de la esponja *Mycale* sp. así como tres muestras de agua de mar mediante buceo libre a una profundidad aproximada de 5 m; se procuró que hubiera una separación mínima de 3 m entre cada organismo seleccionado. Posteriormente las muestras fueron preservadas en hielo y trasladadas al laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR).

Identificación taxonómica de *Mycale* sp.

La identificación taxonómica de la esponja fue realizada a nivel de género por personal del ICMYL de la UNAM, mediante la visualización de las espículas en el microscopio óptico compuesto. La presencia en particular de las microscleras denominadas anisoquelas palmeadas, es el carácter taxonómico que define a este género (Carballo & Barraza, 2010). La identidad de la especie no pudo ser definida debido a la complejidad que representa su clasificación así como a los pocos estudios taxonómicos que se han realizado en la región, por lo que se requieren estudios más completos por parte de taxónomos expertos. Los ejemplares utilizados en el presente estudio se encuentran depositados en las instalaciones del laboratorio de Microbiología en el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN). En la figura 2 se observa un ejemplar del área de estudio.

Phylum: Porifera

Clase: Demospongiae

Orden: Poecilosclerida

Familia: Mycalidae (Lundbeck, 1905)

Género: *Mycale* (Gray, 1867)



Figura 2. *Mycale* sp. Fotografía: Carlos Sánchez.

Trabajo en Laboratorio

En el laboratorio, muestras fueron procesadas de manera inmediata para lo cual, se cortaron trozos de cada esponja con un bisturí esterilizado, los cuales fueron enjuagados con agua de mar estéril y pesados hasta obtener 5 g. Posteriormente los trozos se maceraron con 45 mL de agua de mar filtrada con una membrana de policarbonato de 0.2 μm y esterilizada mediante autoclave. A partir de este macerado se realizaron diluciones decimales de 10^{-1} a 10^{-5} , obteniendo tres réplicas para cada dilución. De las diferentes diluciones se tomaron 100 μL de la muestra de esponja macerada y de las muestras de agua de mar, las cuales se sembraron en cajas Petri con agar marino y se incubaron a 35° C durante 24 a 48 hrs. Una vez que se observó crecimiento bacteriano se inició el conteo de colonias para determinar el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC's) en cada una de las cajas Petri que contaban con una densidad de 30 a 300 colonias (Thakur & Anil, 2000). Después de dicho conteo, se procedió a hacer la descripción de las colonias aisladas con ayuda de estereomicroscopio marca ZEISS Stemi (SVII) para llevar a cabo la selección de morfotipos diferentes.

Posteriormente las colonias seleccionadas fueron resembradas nuevamente en medio de cultivo Agar Tripticasa Soya (TSA) al 3.5% y se incubaron a 35° C durante 24 horas. Una vez que se observó crecimiento las cepas fueron resembradas por estría cruzada en el mismo medio. La pureza de las cepas se confirmó nuevamente mediante la morfología colonial y microscópica

(tinción de Gram). Finalmente, las cepas purificadas se resembraron en medio líquido para la obtención de biomasa.

Aislamiento de ADN

Se tomaron 0.5 mL de muestra de los cultivos en medio líquido. Las células se cosecharon por centrifugación a 14000 rpm por 10 minutos a 4° C, el sobrenadante se decantó y al precipitado resultante se le adicionó buffer TE pH 8.0, SDS (Dodecil sulfato de sodio) al 10% y Proteinasa K, la mezcla se agitó en un vortex y se incubó durante una hora a 37° C. Transcurrido este tiempo se adicionaron 100 µL de NaCl 5M y 80 µL CTAB/NaCl mezclando por inversión e incubando 10 minutos a 65° C. Posteriormente se agregó un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó en vortex hasta obtener una solución lechosa, se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos a 24° C, el sobrenadante se recuperó y se transfirió a tubos de 2.0 mL. Se realizó una segunda extracción con un volumen igual de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) mezclándose por inversión. Los tubos se centrifugaron a 14000 rpm por 5 minutos a 4° C. La fase acuosa fue recuperada y la precipitación del ADN se llevó a cabo adicionando 0.6 volúmenes de isopropanol preenfriado a 20 °C. Los tubos se incubaron a 20 °C durante toda la noche. Transcurrido el tiempo de incubación los tubos fueron centrifugados a 14000 rpm por 20 minutos a 4° C. El precipitado resultante (ADN) se lavó con etanol al 70% preenfriado a 20° C, y fue centrifugado nuevamente a 14000 rpm por 10 min; el proceso se realizó en dos ocasiones. La

masa precipitada se dejó secar al aire y se resuspendió en TE pH 8.0 adicionándole ARNsa ($1 \mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$). Los tubos se incubaron en un baño maría Thermolyne Dry-Bath a 37°C por una hora. Se realizó una segunda extracción con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) para eliminar la ARNsa siguiendo el procedimiento mencionado anteriormente. Posteriormente el ADN se visualizó en geles de agarosa al 1% teñidos con SYBER Gold y buffer TBE (Tris-Ácido Bórico-EDTA). Los geles fueron observados bajo luz ultravioleta y se documentaron con un fotodocumentador marca Apollo Instrumentation modelo STX-20.M (Sambrook & Russell 2001; Ausubel *et al.*, 2002). Para la cuantificación de ADN, se realizó una dilución de 1:250 con H_2O destilada y posteriormente homogenizada en un vortex. Se leyeron las absorbancias con la ayuda de un espectrofotómetro marca Eppendorf Biophotometer 22331 a 260 nanómetros. Una vez obtenidas las absorbancias se calculó la concentración de ADN que contenía cada muestra.

Amplificación de ADN mediante PCR.

El ADNr fue amplificado mediante PCR (reacción de cadena de la polimerasa) utilizando oligonucleótidos universales para bacterias 27f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCA-3') y 1385r (5'-GAGTTTGATCCTGGCCTCA-3'). La reacción de amplificación contenía 100 ng de ADN, $0.25 \mu\text{M}$ de cada oligonucleótido, 10mM de dNTP's, $5 \mu\text{L}$ de buffer PCR 10X, MgSO_4 3.33 mM, 1.5 U de Taq polimerasa (INVITROGEN) y agua destilada estéril para tener un

volumen final de 50 μ L (González-Acosta, 2006). Las muestras fueron amplificadas en un termociclador BIORAD MJ Mini PTC-1148 bajo las siguientes condiciones: 4 min a 94° C, 1 min a 55° C, 2 min a 72° C, 29 ciclos de 94° C durante 1 min y 10 min a 72° C. Los productos de PCR se evaluaron en geles de agarosa al 1% teñidos con SYBER Gold. De cada reacción se tomaron 3.0 μ L y se mezclaron con buffer de carga (LB) (Sambrook & Russell 2001). Como estándar se utilizaron 2 μ L del marcador de 10 Kb DNA (INVITROGEN). La electroforesis se corrió a 100V durante 30 minutos. Los resultados se documentaron en un fotodocumentador marca Benchtop UVP.

Secuenciación y análisis genético

El producto de PCR fue enviado a la empresa MACROGEN (Corea) para la purificación del ADN y secuenciación parcial. Las muestras se purificaron usando la precipitación con etanol y la secuenciación se llevó a cabo utilizando un kit BigDye terminator v3.1 Cycle y se corrieron en un secuenciador automático 3730XL. Una vez obtenidas las secuencias, éstas fueron editadas por medio del programa FinchTV 1.4.0, posteriormente cada una fue comparada con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) para encontrar aquella que presentara la mayor similitud e identificar la posible especie de la cual se trataba. Después las secuencia se estandarizaron a 780 pares de bases y se alinearon por medio del software CLUSTAL W. Dicho alineamiento fue refinado manualmente utilizando el programa GeneDoc 2.7.000, finalmente se obtuvo un

árbol filogenético utilizando el método de inferencia bayesiana por medio del software Mr Bayes versión 3.2.1, con cuatro cadenas de 3,000,000 de generaciones y muestreos cada 100 generaciones. El árbol fue editado mediante el programa FigTree v1.3.1.

Ensayo de actividad antibacteriana

El ensayo de actividad antibacteriana se realizó empleando la técnica de difusión en agar (NCCLS, 1993; Elyakov, 1996). Se utilizaron las cepas de bacterias patógenas (*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*) y cepas de vibrios potencialmente patógenos en acuicultura (*Vibrio proteolyticus* ATCC15338, *Vibrio carcharie* ATCC35084, *Vibrio campbelli* ATCC25920, *Vibrio harveyi* ATCC14126, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC17802, *Vibrio azureus* y *Vibrio natriegens*). Al inicio de la serie de los bioensayos, se preparó un pre-inoculo de cada cepa en un medio de TSA, los cuales fueron incubados por 24 h a 35° C. Posteriormente se preparó una suspensión celular con las cepas patógenas y se ajustó a una densidad óptica (DO) de 1 a una λ de 580 nm lo que corresponde aproximadamente a 1×10^8 cel mL⁻¹. Con esta suspensión y se procedió a sembrar masivamente cada una de las cepas patógenas en placas con agar Müller-Hinton. Para las cepas de vibrios, se realizó el mismo procedimiento únicamente utilizando agar TSA al 3.5%.

Por otro lado, las cepas de las bacterias asociadas a la esponja a probar, fueron resembradas en medio de cultivo líquido y se incubaron 24 horas a 35° C.

Posteriormente, el medio fue homogeneizado y se tomó una alícuota de 1.5 mL. Dicha muestra se centrifugó para obtener un sobrenadante, el cual se colocó en pozos de 6 mm realizados con un sacabocados en las cajas de Petri previamente sembradas con las cepas patógenas.

Las cajas de Petri con los orificios se colocaron en el refrigerador durante 40 min, con el fin de retardar el crecimiento microbiano mientras la sustancia antibiótica se difundía sobre el medio. Posteriormente, las cajas de Petri se incubaron a una temperatura de 35° C y se registraron los resultados encontrados a las 24 h midiendo los diámetros de los halos de inhibición (en mm). Los ensayos se realizaron con tres réplicas cada uno y como control positivo se utilizó Ampicilina 1 $\mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$.

RESULTADOS

Aislamiento de bacterias cultivables asociadas a *Mycale* sp.

Los conteos de las colonias aisladas a partir del tejido de la esponja *Mycale* sp, permitieron determinar que la comunidad bacteriana cultivable fue de 2.09×10^7 CFU g⁻¹. A diferencia del agua de mar, donde sólo se contabilizaron 58×10^2 CFU mL⁻¹. El número total de cepas aisladas fue de 50, de las cuales considerando su morfología colonial y microscópica, se seleccionaron 37 (Tabla I). La tinción de Gram y su posterior observación al microscopio evidenció que la mayoría de las cepas aisladas (20) fueron Gram positivas, mientras que 17 cepas fueron Gram negativas. Predominando en ambos casos la morfología de bacilos sobre los cocos (Fig. 3).

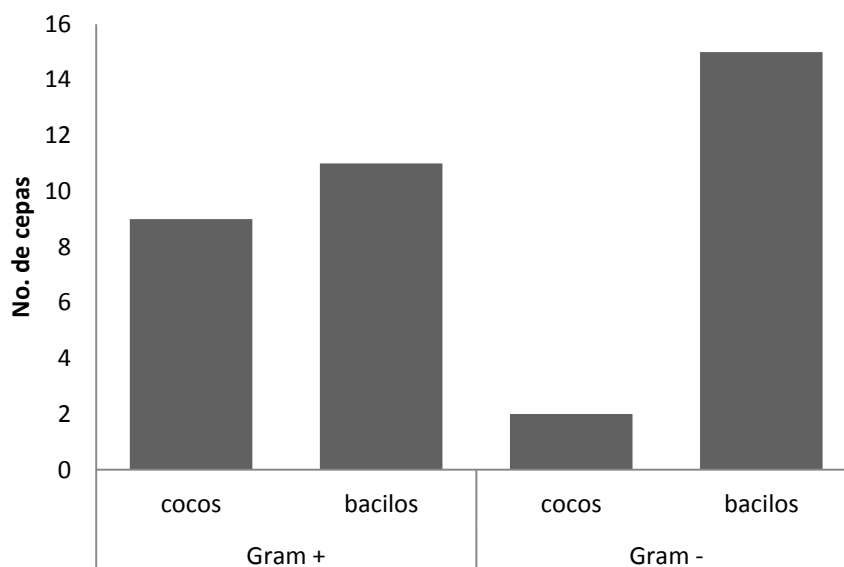


Figura 3. Número de cepas Gram positivas y Gram negativas morfológicamente diferentes aisladas a partir de la esponja *Mycale* sp.

Tabla I. Morfología colonial y microscópica de las bacterias cultivables aisladas de la esponja *Mycale* sp.

Cepa Id	Borde	Forma	Elevación	Color	Morfología	Gram
My0101	Entero	Circular	Crateriforme	Blanco	Bacilos	-
My0102	Entero	Circular	Poco elevado	Beige	Bacilos	-
My0106	Ondulado	Circular	Elevado	Blanco	Bacilos	-
My0108	Entero	Circular	Elevado	Blanco	Bacilos	-
My0110	Entero	Circular	Elevado	Ámbar	Bacilos	-
My0111	Entero	Circular	Elevado	Blanco	Bacilos	-
My0113	Entero	Circular	Plano	Blanco	Bacilos	-
My0114	Entero	Irregular	Elevado	Blanco	Bacilos	-
My0115	Entero	Circular	Elevado	Naranja claro	Bacilos	-
My0119	Entero	Circular	Elevado	Blanco claro	Bacilos	-
My0121	Entero	Circular	Elevado	Ámbar	Bacilos	-
My0125	Entero	Irregular	Umbonado	Ámbar claro	Bacilos	-
My0128	Rizado	Circular	Plano	Blanco pálido	Bacilos	-
My0135	Ondulado	Irregular	Plano	Blanco	Bacilos	-
My0137	Entero	Irregular	Elevado	Blanco	Bacilos	-
My0105	Entero	Circular	Plano	Beige tenue	Cocos	-
My0136	Entero	Irregular	Elevado	Lima	Cocos	-
My0104	Ondulado	Irregular	Plano	Rosa tenue	Bacilos	+
My0116	Entero	Circular	Elevado	Beige	Bacilos	+
My0117	Rizado	Irregular	Plano	Amarillo claro	Bacilos	+
My0118	Entero	Circular	Plano	Naranja	Bacilos	+
My0122	Poco rizado	Circular	Elevado	Lima	Bacilos	+
My0123	Filamentoso	Circular	Poco elevado	Mamey claro	Bacilos	+
My0130	Rizado	Irregular	Plano	Blanco	Bacilos	+
My0131	Entero	Circular	Plano	Leche	Bacilos	+
My0132	Filamentoso	Circular	Poco elevado	Mamey claro	Bacilos	+
My0133	Ondulado	Circular	Plano	Blanco	Bacilos	+
My0134	Lobulado	Circular	Plano	Mamey claro	Bacilos	+
My0103	Entero	Irregular	Plano	Blanco pálido	Cocos	+
My0107	Entero	Circular	Elevado	Mamey	Cocos	+
My0109	Entero	Circular	Plano	Amarillo claro	Cocos	+
My0112	Entero	Circular	Elevado	Blanco pálido	Cocos	+
My0120	Entero	Circular	Plano	Lima	Cocos	+
My0124	Entero	Irregular	Elevado	Amarillo claro	Cocos	+
My0126	Entero	Circular	Elevado	Mamey	Cocos	+
My0127	Entero	Irregular	Elevado	Verde	Cocos	+
My0129	Entero	Irregular	Pulvinado	Amarillo leche	Cocos	+

*Las cepas fueron agrupadas dependiendo de su morfología y tinción de Gram.

Identificación molecular de las bacterias cultivables asociadas a la esponja *Mycale* sp.

De las 37 cepas aisladas de la esponja *Mycale* sp., su ADN fue amplificado mediante Reacción de Cadena Polimerasa (PCR). En la Figura 4 se pueden observar las bandas de amplificación de cada cepa.

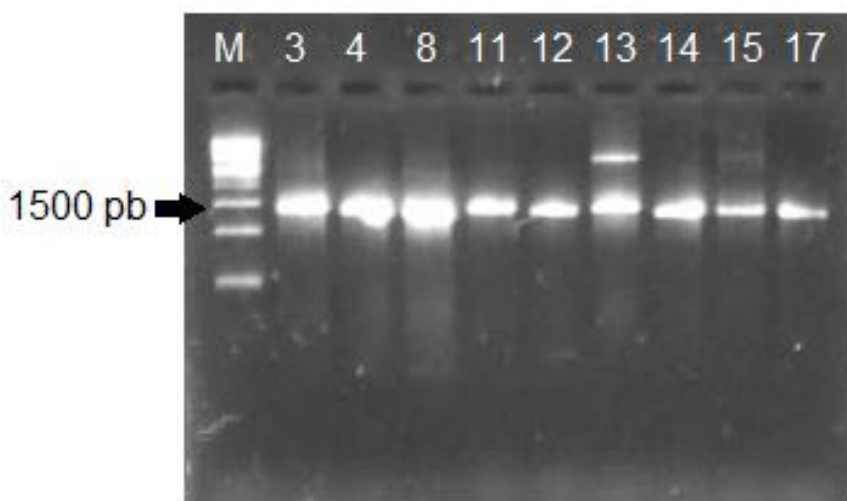


Figura 4. Productos de PCR correspondiente al ADNr 16S de las bacterias aisladas de la esponja *Mycale* sp. Abreviaciones: M) Marcador, 3) Cepa My0103, 4) Cepa My0104, 8) Cepa My0108, 11) Cepa My0111, 12) Cepa My0112, 13) Cepa My0113, 14) Cepa My0114, 15) Cepa My0115, 17) Cepa My0117.

El análisis (BLAST) de alineamiento entre las secuencias parciales del ADNr 16S amplificado y las reportadas en el National Center for Biotechnology Information (NCBI), permitió establecer la identificación taxonómica de las 37 diferentes cepas aisladas (Tabla II).

Tabla II. Comparación de las bacterias asociadas a la esponja *Mycale* sp. con secuencias reportadas en el NCBI

Clave	Pariente más cercano	No. De Acceso (NCBI)	% de identidad
My0108	Alpha proteobacterium JE061	DQ097237.1	100
My0111	<i>Pseudovibrio denitrificans</i> CBMAI 1084	JN615432.1	100
My0112	<i>Staphylococcus epidermidis</i> CIFRI P-TSB-24	JF784034.1	100
My0119	Alpha proteobacterium JE011	DQ097251.1	100
My0122	<i>Bacillus</i> sp. Hs42	JF803860.1	100
My0126	<i>Kocuria palustris</i> TY	JF769747.1	100
My0102	<i>Lysobacter</i> sp. KSA20	GU048937.1	99
My0104	<i>Bacillus</i> sp. B105	EU384288.1	99
My0105	Alpha proteobacterium JE062	DQ097238.3	99
My0106	<i>Halobacillus kuroshimensis</i> HNS013	JN128247.1	99
My0107	<i>Kocuria</i> sp. E7	EU372971.1	99
My0109	<i>Kocuria</i> sp. 0712C1-3	HM222676.1	99
My0110	<i>Vibrio azureus</i> HNS029	JN128263.1	99
My0113	Alpha proteobacterium JE025	DQ097259.2	99
My0114	Alpha proteobacterium F20	DQ227657.1	99
My0115	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. GAS1	EU340848.1	99
My0117	<i>Bacillus</i> sp. BC3	EU768821.1	99
My0121	<i>Vibrio harveyi</i> 11-6DEP	GQ203111.1	99
My0123	<i>Bacillus</i> sp. M71_S32	FN179280.1	99
My0124	<i>Brachybacterium</i> sp. JSM 073088	EU925629.1	99
My0125	<i>Halobacillus trueperi</i> HLSB3	FJ999554.1	99
My0127	<i>Micrococcus</i> sp. N36(2010)	HQ188562.1	99
My0129	<i>Micrococcus</i> sp. MR20-2	GQ163718.1	99
My0133	<i>Bacillus licheniformis</i> ML36	JN791357.1	99
My0135	Alpha proteobacterium CRA 15M	AY562566.1	99
My0137	Alpha proteobacterium JE025	DQ097259.2	99
My0120	<i>Micrococcus</i> sp. MG-2010-D12	FR750272.1	98
My0134	<i>Bacillus</i> sp. MM20	JN791374.1	98
My0130	<i>Bacillus licheniformis</i> CSMCRI-6	HQ156242.1	95
My0136	Alpha proteobacterium JE063	DQ097239.1	92
My0103	<i>Kocuria marina</i> CMGS2	EU073966.1	86
My0132	<i>Bacillus</i> sp. CNJ941 PL04	DQ448803.1	86
My0118	<i>Bacillus</i> sp. MOLA 508	AM990733.1	84
My0131	<i>Bacillus</i> sp. MB127	AB536952.1	84
My0101	<i>Lysobacter capsici</i> M63031	HM032820.1	82
My0128	Rhodobacteraceae bacterium W97	GU826608.1	80
My0116	<i>Bacillus licheniformis</i> F198_A07	DQ234840.1	79

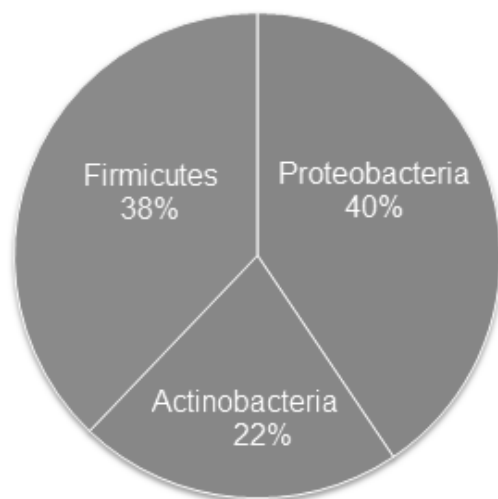


Figura 5. Porcentaje de bacterias correspondientes a los diferentes Fila.

Tabla III. Condensado sobre la posición taxonómica de cada una de las secuencias de las cepas aisladas de la esponja *Mycale* sp.

Clase	Orden	Familia	Género	No. Cepas
α-proteobacteria				8
α-proteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae		1
α-proteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Pseudovibrio</i>	1
γ-proteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Lysobacter</i>	2
γ-proteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	<i>Vibrio</i>	2
γ-proteobacteria	Alteromonadales	Pseudoalteromonadaceae	<i>Pseudoalteromonas</i>	1
Actinobacteridae	Actinomycetales	<i>Dermabacteraceae</i>	<i>Brachybacterium</i>	1
Actinobacteridae	Actinomycetales	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcus</i>	3
Actinobacteridae	Actinomycetales	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Kocuria</i>	4
Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	1
Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Halobacillus</i>	2
Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	11

En resumen, la mayoría de las bacterias identificadas corresponden al filo Proteobacteria, seguidas de Firmicutes y Actinobacteria, los cuales representaron el 40, 38 y 22% respectivamente (Fig. 5). Con una predominancia de las clases

Bacilli, que consistió de 14 cepas (38%) y α -proteobacteria con 10 cepas (27%), de estas últimas, ocho fueron identificadas únicamente a nivel de Clase y una a nivel Familia (Tabla III).

En la Figura 6 se observa claramente la dominancia del género *Bacillus* (11 cepas), seguido de los géneros *Kocuria* (cuatro cepas) y *Micrococcus* (tres cepas). Los géneros *Vibrio*, *Halobacillus* y *Lysobacter* únicamente contaron con la presencia de dos cepas, finalmente los géneros *Pseudoalteromonas*, *Brachybacterium* y *Staphylococcus* fueron representados por una sola cepa.

En cuanto a la diversidad de especies aisladas, *Bacillus* sp. seguida de *Bacillus licheniformes* y *Micrococcus* sp. fueron las más frecuentes (Fig. 7).

El árbol de homologías elaborado por medio de un análisis Bayesiano presenta valores de probabilidad posterior mayores a 0.5 (Fig. 8), también se observa la formación de tres grandes grupos bien soportados (100% pp) y conformados por los Fila Proteobacteria, Actinobacteria y Firmicutes. Cada uno de estos grandes clados poseen, a su vez, diferentes ramas o subgrupos. El primer clado, Proteobacteria, presenta dos grandes divisiones compuestas por los grupos α -proteobacteria y γ -proteobacteria, los cuales a su vez poseen pequeñas ramificaciones; los grupos *Vibrio*, *Pseudoalteromonas* y *Lysobacter* perteneciendo a γ -proteobacteria, y *Pseudovibrio* a α -proteobacteria. El segundo clado, Firmicutes, se forman dos grandes ramas compuestas por los grupos *Bacillus* y *Hallobacillus*. Finalmente el clado actinobacteria posee tres grupos conformados por *Micrococcus*, *Kocuria* y *Brachybacterium*.

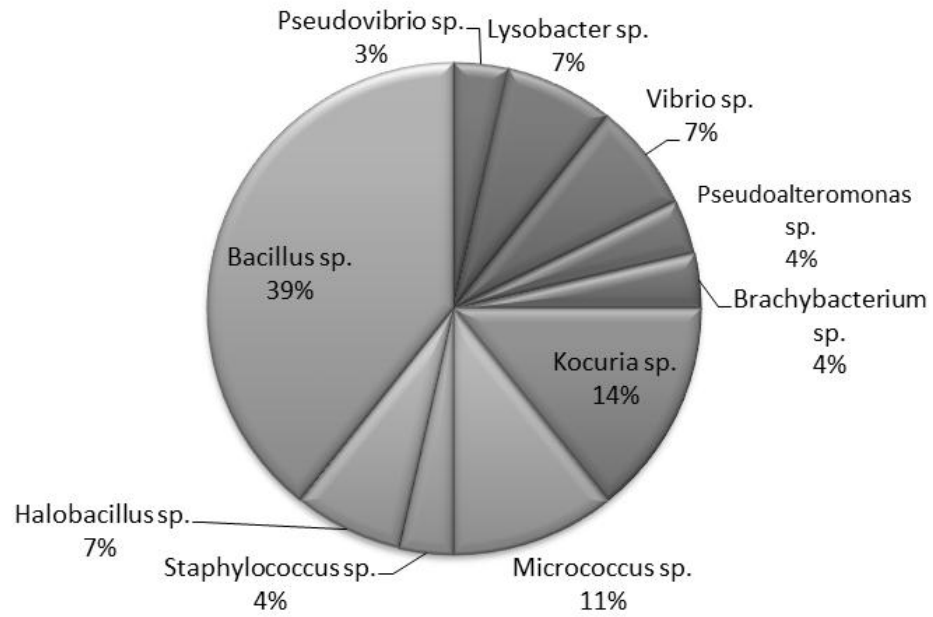


Figura 6. Representación porcentual de los diferentes géneros de bacterias aisladas de la esponja *Mycale* sp.

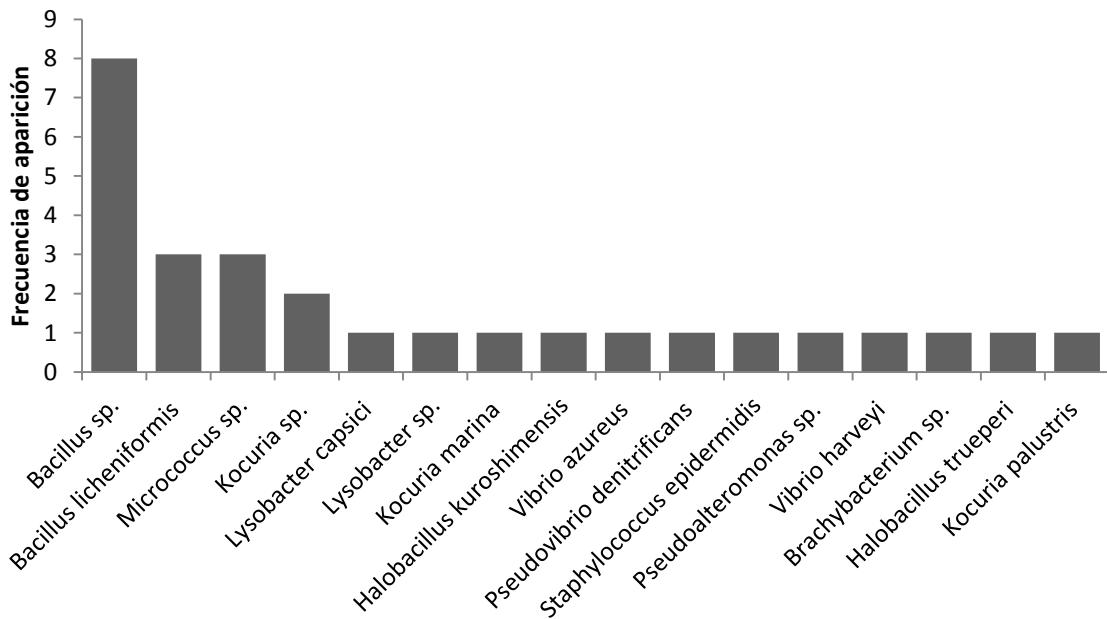


Figura 7. Especies de bacterias aisladas de la esponja *Mycale* sp.

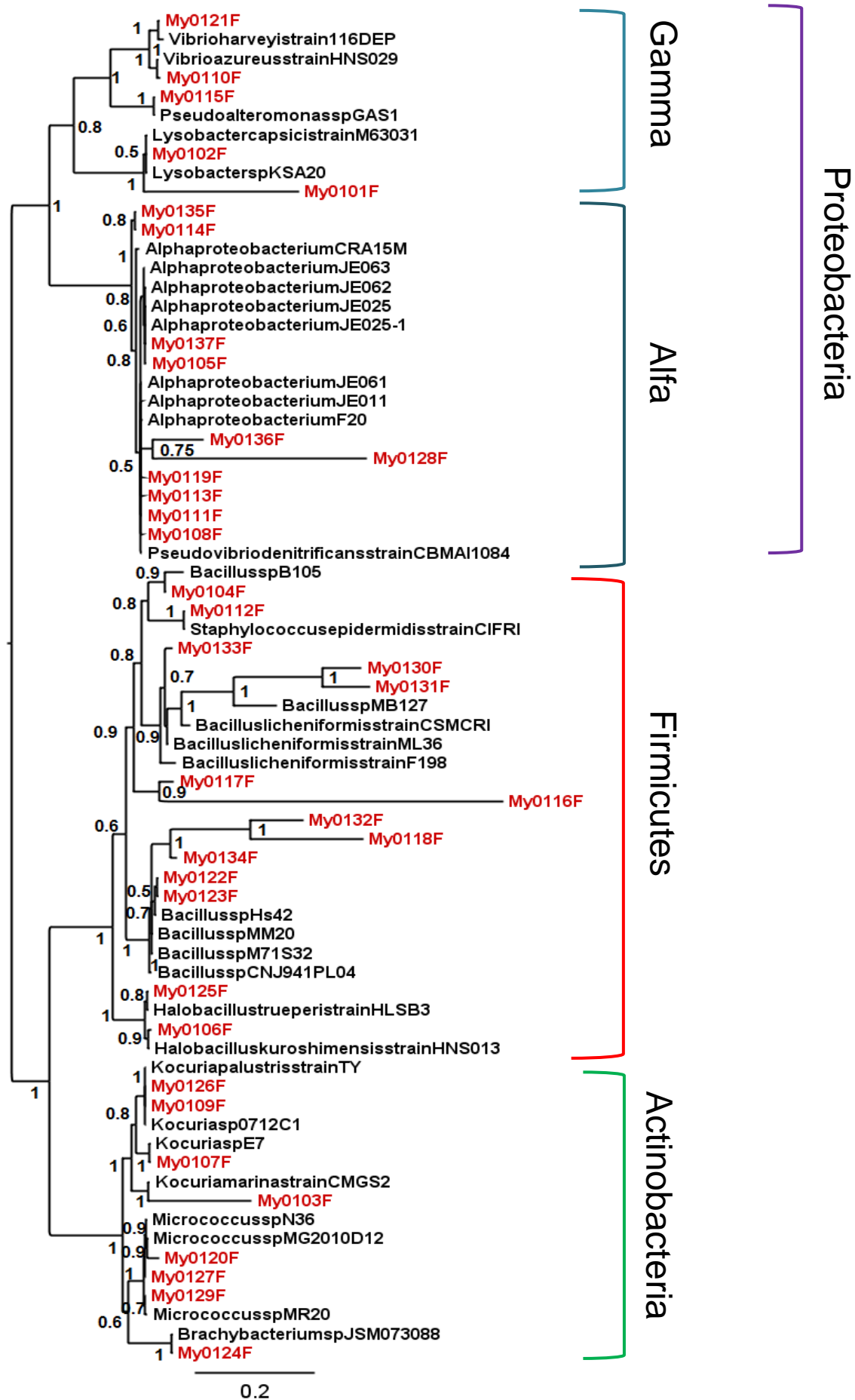


Figura 8. Árbol bayesiano obtenido a partir de la secuencias parciales del ADNr 16S de cepas cultivables asociadas a *Mycale* sp.

Actividad antibacteriana frente a cepas de bacterias patógenas

Los resultados de los ensayos de actividad antibacteriana se muestran en la Tabla IV. Únicamente se presentan las 18 cepas que dieron resultados positivos frente a alguna de las cepas patógenas, las 19 cepas restantes no fueron activas.

Tabla IV. Cepas con actividad antimicrobiana positiva aisladas de la esponja *Mycale* sp. Valores promedio (mm) del halo de inhibición \pm desviación estándar.

Cepa Id	Especie	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>V. carcharie</i>
Cepas Gram Negativas				
My0101	<i>Lysobacter capsici</i> M63031	13 \pm 1	12 \pm 0.8	
My0102	<i>Lysobacter</i> sp. KSA20	15 \pm 0.8	12 \pm 0.6	
My0108	Alpha proteobacterium JE061	15 \pm 0.5	11 \pm 0.6	
My0114	Alpha proteobacterium F20	14 \pm 0.5	11 \pm 1	12 \pm 0.5
My0115	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. GAS1	14 \pm 0.5	12 \pm 0.8	12 \pm 0.8
My0128	<i>Rhodobacteraceae bacterium</i> W97	13 \pm 0.5	10 \pm 1	13 \pm 1.1
My0135	Alpha proteobacterium CRA 15M	13 \pm 0.8	12 \pm 0.9	
Cepas Gram Positivas				
My0104	<i>Bacillus</i> sp. B105	13 \pm 0.8		
My0116	<i>Bacillus licheniformis</i> F198_A07	13 \pm 0.6	10 \pm 0.6	
My0118	<i>Bacillus</i> sp. MOLA 508	13 \pm 0.6	10 \pm 0.5	12 \pm 1
My0123	<i>Bacillus</i> sp. M71_S32	13 \pm 0.6	11 \pm 0.5	
My0130	<i>Bacillus licheniformis</i> CSMCRI-6			18 \pm 1.7
My0131	<i>Bacillus</i> sp. MB127	14 \pm 0.5	11 \pm 1	
My0132	<i>Bacillus</i> sp. CNJ941 PL04	13 \pm 1.3	17 \pm 0.5	
My0134	<i>Bacillus</i> sp. MM20	14 \pm 0.5	10 \pm 0.5	
My0112	<i>Staphylococcus epidermidis</i> CIFRI P-TSB-24	13.5 \pm 1.3	11 \pm 0.8	
My0106	<i>Halobacillus kuroshimensis</i> HNS013	14 \pm 1	12 \pm 0.5	
My0125	<i>Halobacillus trueperi</i> HLSB3	12 \pm 0.5	11 \pm 0.5	
	Control positivo Ampicilina	40 \pm 0.5	30 \pm 1	40 \pm 0.5

De las cepas activas, la mayoría inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, siendo las cepas My0102 (*Lysobacter* sp.) y My0108 (Alphaproteobacterium F20) las que presentaron los mayores halos de inhibición (15 mm). Mientras que frente a *E. coli*, la cepa My0132 (*Bacillus* sp.) fue la que

presentó el mayor halo de inhibición de 17 mm. En los bioensayos frente a diferentes especies del género *Vibrio*, únicamente fueron positivas frente a *V. carcharie*, siendo la cepa My0130 (*Bacillus licheniformis* CSMCRI-6) la que presentó el mejor halo de inhibición (18 mm). En la figura 9 se observan algunos ejemplos de los resultados obtenidos, el halo del centro de cada caja Petri representa el control positivo (antibiótico).

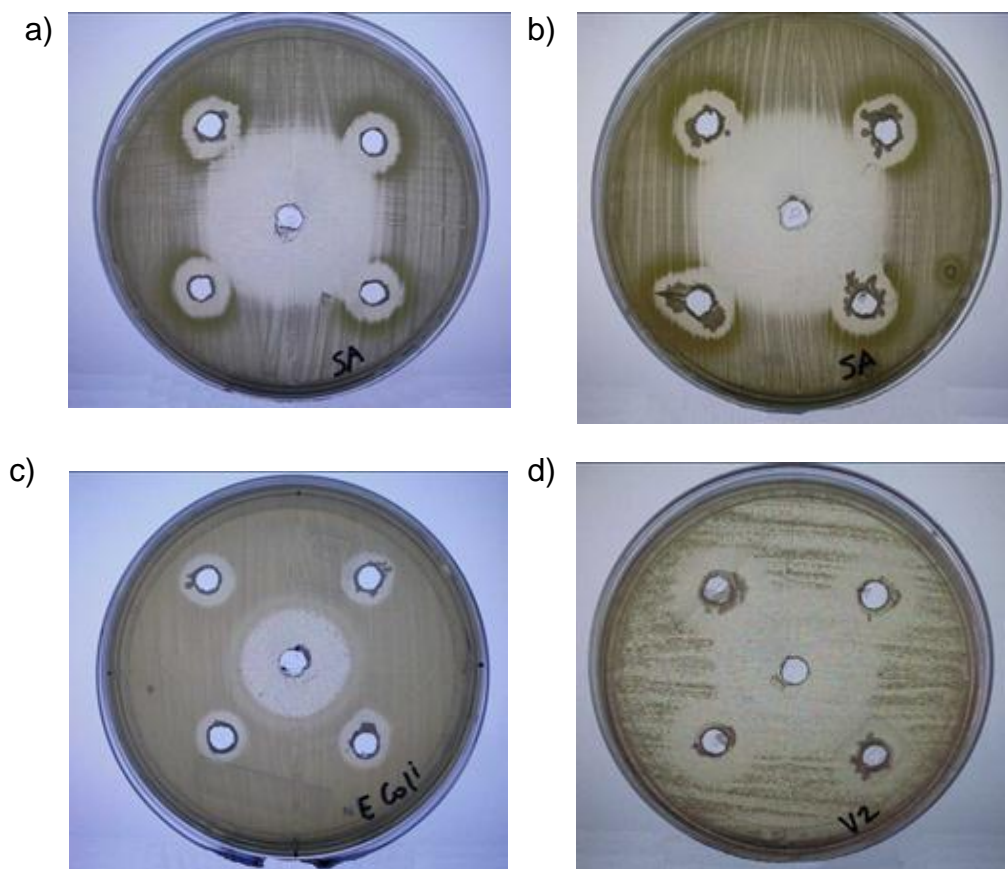


Figura 9. Ejemplos de halos de inhibición de las bacterias asociadas a la esponja *Mycale* sp. frente a las cepas *S. aureus* (a y b), *E. coli* (c) y *V. carcharie* (d).

DISCUSION

Aislamiento de bacterias cultivables asociadas a *Mycale* sp.

De toda la microbiota marina, sólo el 1% es potencialmente cultivable (Sherr & Sherr, 2000), en esta investigación, los aislamientos obtenidos sólo representan al grupo de bacterias heterótrofas cultivables.

Con base en la morfología colonial (elevación, tamaño, forma, pigmentación) y microscópica (forma de la célula, tinción de Gram), se eligieron 37 cepas con morfotipos diferentes de las 50 inicialmente aisladas de la esponja *Mycale* sp. La forma de una colonia varía dependiendo de ciertos factores ambientales como la temperatura de incubación, la edad del cultivo y la composición del medio (Rodríguez *et al.*, 2006).

Las variaciones en el número de cepas susceptibles de ser cultivadas, puede deberse a diferentes factores tanto ambientales como metodológicos; el uso de diferentes medios de cultivo, así como las técnicas de separación de las bacterias del tejido de la esponja puede impactar de manera diferente los resultados obtenidos (Toledo *et al.*, 2006). Resulta evidente que el número de cepas aisladas en este trabajo (37) fue mayor con respecto a estudios similares con esponjas del mismo género. A partir de la esponja *M. adhaerens*, Lee y Qian (2004) aislaron 20 cepas morfológicamente distintas; por otra parte, de la esponja *M. armata* recolectada de los mares de Hawaii, únicamente se aislaron 11 cepas, aun cuando se utilizaron nuevas técnicas de cultivo (Toledo *et al.*, 2006).

Posteriormente Santos *et al.* (2010) registraron 24 cepas cultivables de *M. sigmatosa* recolectada en Brasil.

De acuerdo con Santavy *et al.* (1990) el tamaño y la morfología de las bacterias asociadas a esponjas suele ser muy variable, pero con predominancia de las formas de coco y bacilo. Esto concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo, ya que las únicas formas que se reportaron fueron de tipo coco y bacilo (Tabla I).

En algunos trabajos se ha observado que las bacterias asociadas a esponjas son Gram negativas, argumento que se sustenta en la dominancia del Fila Proteobacteria dentro de éstas (Santavy *et al.*, 1990; Chelossi *et al.*, 2004). Si bien, en el presente trabajo, el Fila Proteobacteria fue dominante (40%), el resto de las cepas aisladas (60%) pertenecieron a los Fila Firmicutes y Actinobacteria, ambos grupos Gram positivos, lo que dio como resultado (Figura 3) que la mayoría de las cepas asociadas a *Mycale* sp. se caracterizan por ser Gram positivas y con forma de bacilo. La diferencia de los resultados obtenidos con la literatura puede deberse a las diferentes condiciones de cultivo.

El número de unidades formadoras de colonias por gramo de esponja para *Mycale* sp. fue de 2.09×10^7 . Meyer y Keuver (2007), con base en el trabajo realizado con la esponja *Polymastia corticata*, argumentan que la densidad de bacterias en un gramo de peso húmedo de esponja puede variar de 10^8 hasta 10^{10} ; al comparar este dato con el resultado obtenido en este trabajo se observó que el número de UFC de *Mycale* sp. es menor, sin embargo, la cantidad de UFC

puede variar dependiendo de la especie en cuestión, Muscholl-Silberhorn *et al.* (2007) reportaron valores de 9.5×10^4 UFC mL⁻¹ para la esponja *Chondrosia reniformis*, y 6.3×10^6 UFC mL⁻¹ para *Tethya aurantium*. Por otra parte, el conteo total de bacterias presentes en el tejido de una esponja puede superar de uno a tres órdenes de magnitud un conteo total de bacterias presentes en una muestra de agua marina (Friedrich *et al.*, 2001; Webster & Hill, 2001), lo cual se corrobora en este estudio debido a que en el agua de mar circundante a *Mycale* sp. se contabilizaron 5.8×10^2 UFC mL⁻¹.

Las bacterias asociadas a las esponjas suelen vivir principalmente fuera de las células del mesohilo del invertebrado, colonizando posteriormente las capas exteriores y superficie de la esponja (Albrechts, 2006). La distribución diferencial de microorganismos es de suponerse, debido a las condiciones micro-ambientales específicas dentro de una sola esponja. Al tratarse de organismos filtradores, el bombeo constante del agua permite un gradiente en la concentración de oxígeno, así mismo la cantidad de luz que reciben tanto las capas exteriores como las interiores y la competencia por la alta densidad poblacional son algunos de los factores que afectan la distribución espacial de sus microorganismos simbioses (Yang & Li, 2012). A pesar de éstas diferencias, los resultados obtenidos en diversos estudios no ofrecen una respuesta clara, puesto que en lo que respecta a los grupos reportados en el presente trabajo (aislados del mesohilo), todos los Filas se han encontrado en otros estudios tanto en la corteza como en el mesohilo de la esponja (Meyer & Keuver, 2007; Thiel *et al.*, 2007; Sipkema & Blanch, 2010).

Identificación molecular de las bacterias cultivables asociadas a la esponja *Mycale* sp.

La identificación genética de las 37 cepas aisladas se realizó mediante la secuenciación parcial del gen del ADNr 16S, método aceptado actualmente en la sistemática bacteriana porque ha permitido establecer identidades genéticas así como relaciones evolutivas entre los microorganismos de manera certera (Figura 8) (Ki *et al.*, 2009; Imhoff, 2011; Zhi *et al.*, 2012). La proporción de información contenida en la longitud del número de pares de bases del gen es relativamente alta, aportando buena resolución y árboles filogenéticos con relaciones evolutivas robustas que van desde el nivel Fila hasta Género (Ludwig & Schleifer, 1994; Barraclough *et al.*, 2012). Por otra parte, la presencia de secuencias altamente conservadas (universales) en organismos, así como en secuencias muy variables (específicas) entre especies y grupos bacterianos, ha representado la clave del éxito del uso del gen ribosomal 16S (Olmos, 2004).

Las identidades genéticas obtenidas a partir de las secuencias de las cepas aisladas de *Mycale* sp., fueron agrupadas en un taxón en específico; 29 a nivel Especie, ocho a nivel Clase y una a nivel Familia (Tabla III). Por otra parte los porcentajes de identidad o parentesco se encontraron en un intervalo de 79% a 100% (Tabla II).

En la actualidad un porcentaje de divergencia del 1% entre secuencias del ADNr 16S, indica que se trata de la misma especie (99-100%), mientras que valores menores al 99% hacen referencia a posibles nuevas especies (Schloss &

Handelsman, 2005; Stackebrandt & Ebers, 2006; Barraclough *et al.*, 2012). Este argumento se basa en estudios realizados con el método de hibridación ADN:ADN, el cual mide el grado de relación entre organismos altamente emparentados y proporciona evidencia de que valores de similitud del ARNr 16S por debajo del 99% indican que es poco probable que compartan entre el 60-70% de similitud de ADN (Madigan *et al.*, 2006; Stackebrandt & Ebers, 2006; Kämpfer, 2012).

Únicamente 11 cepas poseen un porcentaje de identidad menor al 99% (Tabla II), por lo que podrían considerarse como nuevas especies, aunque para ratificarlo sería necesario una aproximación taxonómica polifásica, esto es, una combinación de características fenotípicas, genómicas y filogenéticas, que permitan obtener una clasificación adecuada (Otero, 2011; Kämpfer, 2012).

La presencia del grupo Proteobacteria en la microbiota que habita en las esponjas marinas ha sido bien documentada (Burja & Hill, 2001; Li *et al.*, 2007), y las esponjas del género *Mycale* no han sido la excepción (Mohamed *et al.*, 2008a); se sabe que probablemente la transmisión de estas bacterias sucede por medio de las larvas (Enticknap *et al.*, 2006), o a través de su adquisición directamente de la filtración del agua marina (Lee *et al.*, 2009). Cuando la transmisión de éstas bacterias ocurre de padres a hijos, puede que se trate de cepas específicas entre las esponjas, lo cual significa que probablemente el inquilino y su hospedero han coevolucionado a lo largo del tiempo y que por lo tanto éstas bacterias específicas no se encuentran en la columna de agua circundante, denominándose como

simbiontes verdaderos (Enticknap *et al.*, 2006). Lo cual podría ser el caso de las proteobacterias aisladas de *Mycale* sp. con número de cepa My0101, My0102, My0105, My0108, My0137, My0110, My0111, My0113, My0114, My0115, My0119, My0121, My0128, My0135 y My0136.

Dentro de éste filo, la clase α -proteobacteria es la más comúnmente reportada como dominante en las secuencias genéticas obtenidas de bacterias asociadas a esponjas marinas (Webster *et al.*, 2001; Webster & Hill, 2001; Mohamed *et al.*, 2008a), así como la familia Rhodobacteraceae (Althoff *et al.*, 1998; Toledo *et al.*, 2006) y el género *Pseudovibrio*, cuya presencia ha sido reportada en siete géneros de esponjas diferentes alrededor del mundo (Lafi *et al.*, 2005; Enticknap *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008) y el cual se cree que juega un papel importante en la salud de la esponja hospedera, puesto que su presencia se limita únicamente a esponjas saludables (Webster *et al.*, 2008).

Le sigue la clase γ -proteobacteria, dentro de la cual tenemos a los géneros *Lysobacter* (Feby & Nair, 2010; Romanenko *et al.*, 2012), *Vibrio* (Qian *et al.*, 2006; Feby & Nair, 2010) y *Pseudoalteromonas* (Thakur & Anil, 2000; Lee & Qian, 2004), los cuales también han sido detectados en las poblaciones bacterianas asociada a las esponjas marinas, e incluso en otros invertebrados marinos.

El rol ecológico que cumplen las proteobacterias asociadas a esponjas aún es incierto; evidencia reciente demuestra su participación en la fijación de nitrógeno, hecho que comúnmente se creía exclusivo de las cianobacterias (Shieh & Lin, 1994; Mohamed *et al.*, 2008b). Por otra parte la producción de N-acil

homoserina lactonas se encuentra íntimamente ligada con la señalización química de poblaciones bacterianas, por lo que se sospecha que las proteobacterias productoras de dicho químico puedan estar involucradas en la regulación de la densidad poblacional, e incluso en el mismo comportamiento de la esponja (Mohamed *et al.*, 2008c)

Existen investigaciones que documentan la presencia de los mismos grupos bacterianos en esponjas del mismo género, aun cuando se encuentran en lugares diferentes (Hentschel *et al.*, 2002). También se ha observado que esponjas de géneros distintos, que habitan una misma área determinada, poseen grupos similares e inclusive iguales (Lafi *et al.*, 2005). Entre estos grupos de bacterias característicos, se colocan los Fila Actinobacteria y Firmicutes, entre otros.

Los actinomicetos son un grupo popular en el aislamiento de bacterias asociadas a esponjas marinas debido a que presentan interesantes actividades biológicas que los hacen candidatos para la búsqueda de productos naturales. Son varios los trabajos que verifican la actividad antibacteriana que posee este grupo en particular (Li & Liu, 2006; Chelossi *et al.*, 2004; Radjasa, 2008 Selvin *et al.*, 2009). El aislamiento y cultivo en el laboratorio de este grupo es de los más complicados, y a pesar de utilizar diferentes medios de cultivo, es poca la diversidad de especies registrada. En el presente trabajo fue posible el aislamiento de ocho cepas pertenecientes al grupo de los actinomicetos, aunque únicamente representan tres géneros, de los cuales ninguno presentó actividad antimicrobiana. Los géneros *Kocuria* y *Micrococcus* ya han sido reportados

previamente para la esponja *Mycale adhaerens* (Li, 2009), por otra parte el género *Brachybacterium* es menos común, sin embargo, su presencia ha sido documentada en esponjas del mar de Java (Radjasa, 2007; Sabarathnam *et al.* 2010).

El nicho ecológico que ocupan los actinomicetos en asociación con esponjas marinas es todavía desconocido. Sabarathnam *et al.* (2010) propusieron su participación en el ciclo biogeoquímico del fósforo, siendo las responsables de la solubilización de fosfatos, permitiendo que sean accesibles para su esponja hospedera.

Finalmente el tercer filo reportado en este trabajo (Figura 5) fue Firmicutes. Dentro del cual, el género predominante fue *Bacillus*, con la presencia de 11 cepas (Figura 6). Los bacilos son habitantes comunes tanto en el ambiente marino como en las esponjas, tan solo basta mencionar que se han encontrado en la microbiota asociada a *Dysidea granulosa*, *Sigmadoscia (Haliclona) fibulata* (Feby & Nair, 2010), *Dysidea avara*, *Craniella australiensis* y *Stelletta tenuis* (Li *et al.*, 2007), entre otras. Para las esponjas del género *Mycale*, Lee *et al.* (2006) reportan la presencia de la especie *Bacillus licheniformes* en *M. adhaerens*, mientras que Wang *et al.* (2008) confirman la existencia de cepas pertenecientes al Filo Firmicutes en general, en la esponja *Mycale armata*.

La presencia del género *Bacillus* en asociación con esponjas marinas es tan común que se ha propuesto su especificidad para éstos invertebrados, además dicho género ha demostrado una eficiente producción de compuestos con

actividad antibacteriana, por lo que se sugiere que evitan la fijación de bacterias en los tejidos superficiales de la esponja (Thakur *et al.*, 2004).

Como se ha mencionado anteriormente, todas las cepas reportadas en el presente estudio, ya han sido aisladas a partir de otras esponjas del género *Mycale* en diferentes mares alrededor del mundo, lo que probablemente signifique que se trata de bacterias simbiotes específicas del género, las cuales poseen roles ecológicos particulares en la esponja que aún son desconocidos y pueden ser el objetivo de futuras investigaciones.

Actividad antibacteriana frente a cepas de bacterias patógenas

La constante competencia a la cual se encuentran sometidas las poblaciones bacterianas que habitan en los tejidos de las esponjas marinas ha provocado reacciones inhibitorias entre microorganismos que se manifiestan mediante la producción de metabolitos activos. La búsqueda y el aislamiento de bacterias marinas productoras de compuestos antimicrobianos en esponjas marinas ha sido la causa de la creciente investigación dirigida por microbiólogos (Radjasa, 2007)

Los metabolitos secundarios entre los que se encuentran los antibióticos, tienen una función protectora en el medio ambiente. Las bacterias desarrollan la capacidad de producir sustancias que eliminan o inhiben el crecimiento de otros microorganismos como un mecanismo de defensa; tales sustancias producidas de

forma natural juegan un papel ecológico importante en el ecosistema marino (Lugioyo *et al.*, 2003). Dentro de los beneficios que recibe una esponja al hospedar bacterias productoras de compuestos antibacteriales encontramos la regulación de la población procariota, la capacidad para competir con otras esponjas, la defensa contra microorganismos epibióticos y el ahorro de energía al no tener que elaborar dichos compuestos activos (Hentschel *et al.*, 2001; Chelossi *et al.*, 2004).

En general, el número de cepas activas que se ha reportado en otras investigaciones suele ser menor a un 10% del total de cepas que se logran cultivar (Chelossi *et al.*, 2004). Zheng *et al.* (2005) detectaron únicamente ocho cepas activas de un total de 29, así como Santos *et al.* (2010) reportaron 12 cepas de un total de 158. En nuestro caso, el 48% de las cepas aisladas, de un total de 37, presentaron actividad por lo menos frente a un agente patógeno (Tabla IV), la mayoría de las cepas activas pertenecieron al Filo Firmicutes, mientras que el resto al Filo Proteobacteria.

En general, las bacterias Gram-positivas representan una fuente potencial de sustancias antibióticas como se puede constatar en esta y otras investigaciones, que pudieran resultar incluso nuevas con relación a las producidas por las bacterias terrestres, por estar expuestas a diferentes condiciones ambientales (Fenical & Jensen, 1993).

Las propiedades antimicrobianas y antiepibióticas de cepas pertenecientes al género *Bacillus* aisladas de diferentes esponjas marinas ha sido bien

documentada (Thakur & Anil, 2000; Hentschel *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2005; Muscholl-Silberhorn *et al.*, 2007). Kanagasabhpathy *et al.* (2004), reportaron bacterias Gram positivas, posiblemente pertenecientes al género *Bacillus*, aisladas de esponjas marinas de la India, con actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Posteriormente Kanagasabhpathy, *et al.* (2005) detectaron actividad inhibitoria de cepas pertenecientes a *Bacillus*, aisladas de la esponja *Pseudoceratina purpurea*, frente a cepas consideradas epibióticas. Los autores argumentan que *Bacillus* es uno de los géneros más destacados en la producción de compuestos activos, incluso se han observado cepas con actividad antifúngica y citotóxica (Zuber *et al.*, 1993; Thakur & Anil, 2000). En los resultados de este trabajo, se observa de manera clara que las cepas aisladas pertenecientes a dicho género (My0104, My0116, My0118, My0123, My0130, My0132, My0134 y My0112) presentaron actividad al menos frente a una cepa de referencia.

En especial, *Bacillus licheniformis* es una bacteria que se ha caracterizado por su bioactividad y de la cual ya se han obtenido compuestos con actividad antibacteriana y antifúngica (Devi *et al.*, 2010). En este trabajo, *B. licheniformis* (My0116, My0130) fueron activas frente a *E. coli*, *S. aureus* y *Vibrio carcharie*, presentando uno de los mayores halos de inhibición para éste último.

Por lo que respecta al género *Halobacillus* (My0106 y My0125), su presencia en la microbiota de las esponjas marinas es poco usual, además de que las cepas que se han obtenido no han presentado ningún tipo de bioactividad (Burja & Hill, 2001; Lee *et al.*, 2006). Sin embargo, en el presente trabajo, dicho

género presentó actividad frente a *E. coli* y *S. aureus*, hecho que concuerda con otros estudios realizados en ambientes marinos (sedimentos y pastos marinos), de los cuales se han logrado aislar cepas con actividad antifúngica (Yang *et al.*, 2002) y antibacteriana (Teasdale *et al.*, 2009).

Las α -proteobacterias también se han destacado por su actividad antibacteriana, en el presente trabajo sólo cuatro cepas (Cepas My0108, My0114 y My0135, Tabla IV) pertenecientes a dicho grupo presentaron actividad inhibitoria frente a *E. coli*, *S. aureus* y *Vibrio carcharie*. Muscholl-Silberhorn *et al.* (2007) encontraron destacada actividad frente a cepas patógenas (*E. coli*, *S. aureus*, *Candida albicans* y *C. glabrata*) por parte de α -proteobacterias aisladas de 10 diferentes especies de esponjas en el mar Adriático; así como Hentschel *et al.* (2001) en cepas aisladas de esponjas del género *Aplysina*.

Dentro de la clase γ -proteobacteria, el género *Pseudoalteromonas* es uno de los más activos, puesto que se han obtenido resultados satisfactorios en pruebas antimicrobianas realizadas en diversos trabajos (Hentschel *et al.*, 2001; Chelossi *et al.*, 2004). En el presente estudio, la cepa My0115 fue activa frente a las tres cepas de referencia utilizadas (Tabla IV). En nuestro país, Cetina *et al.* (2010) aislaron cepas de dicho género provenientes de aguas del Golfo de México, las cuales demostraron poseer una interesante actividad antibacteriana. En contraste, el género *Lysobacter* no es frecuentemente mencionado en trabajos relacionados con poblaciones bacterianas de esponjas, pero su presencia es común en suelos (Romanenko *et al.*, 2012). Aunque las cepas marinas no han demostrado

bioactividad, sus congéneres terrestres han servido para el aislamiento de nuevos antibióticos (Islam, 2007). A diferencia de lo mencionado en la literatura, la cepa My0101 perteneciente al mismo género (Tabla IV) presentó actividad frente a *E. coli* y *S. aureus*.

CONCLUSIONES

- A partir de la esponja *Mycale* sp. de la localidad de Pichilingue dentro de la Bahía de La Paz, B.C.S., se lograron aislar 37 cepas de bacterias asociadas, siendo en su mayoría bacterias Gram positivas con forma de bacilo.
- El número de UFC por gramo de esponja fue de 2.09×10^7 , mientras que en el agua de mar se contabilizaron 58×10^2 CFU mL⁻¹, esto debido a que el conteo total de bacterias presentes en el tejido de una esponja puede superar de uno a tres órdenes de magnitud un conteo total de bacterias presentes en una muestra de agua marina.
- La mayoría de las cepas identificadas pertenecen al grupo de las proteobacterias, el cual se ha destacado por su predominancia en las comunidades bacterianas asociadas a esponjas, a éste le siguen los grupos Firmicutes y Actinobacteria los cuales, aunque no son dominantes, también son comúnmente observados. Los mejor representados fueron *Bacillus* y *Kocuria* con 11 y 4 cepas respectivamente.
- El 49% de las cepas presento actividad antibacteriana al menos frente a una de las cepas patógenas probadas, porcentaje superior al comúnmente reportado en la literatura.
- La mayoría de las cepas fueron activas frente a *S. aureus* y *E. coli*, con halos de inhibición de entre 15 y 17 mm. Siendo las cepas My0102

(*Lysobacter* sp.), My0108 (α -proteobacteria) y My0132 (*B. licheniformis*), las que presentan el mayor potencial antibacteriano. Por otra parte, frente a *V. carcharie* únicamente cinco cepas fueron activas, siendo la cepa My0130 (*B. licheniformis*) la que presentó los mejores resultados con halos de inhibición de 18 mm.

BIBLIOGRAFÍA

- Albrechts, C. 2006. *Sponge-associated bacteria: specificity, diversity and antimicrobial potential*. Tesis de Doctorado. IFM-GEOMAR. Alemania.106 p.
- Althoff, K., C. Schütt, R. Steffen, R. Batel & W. Müller. 1998. Evidence for a symbiosis between bacteria of the genus *Rhodobacter* and the marine sponge *Halichondria panicea*: harbor also for putatively toxic bacteria?. *Marine Biology*, 130: 529-536.
- Ausubel F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith & K. Struhl. 2002. *Short protocols in molecular biology: A compendium of methods from current protocols in molecular biology*. 5th Ed. John Wiley and Sons, Inc. E.U.A. 1298 p.
- Barraclough, T., K. Balbi & R. Ellis. 2012. Evolving Concepts of Bacterial Species. *Evolutionary Biology*, 39: 148-157.
- Blunt, J.W., B. Copp, M. Munro, P. Northcote & M. Prinsep. 2003. Marine Natural Products. *Natural Products Reports*, 20: 1-48.
- Burja, A. & R. Hill. 2001. Microbial symbionts of the Australian Great Barrier Reef sponge, *Candidaspongia flabellata*. *Hydrobiologia*, 461: 41-47
- Capon, R., S. Rochfort & S. Ovenden. 1997. Mycaperoxides F and G and a related norterpene ketone from Southern Australian marine sponges, *Mycale* Species. *Journal of Natural Products*, 60: 1261-1264.

- Carballo, J. & J. Cruz-Barraza. 2010. A revision of the genus *Mycale* (Poecilosclerida: Mycalidae) from the Mexican Pacific Ocean. *Contributions to Zoology*, 79(4): 165-191.
- Cetina, A., A. Matos, G. Garma, H. Barba, R. Vázquez, A. Zepeda-Rodríguez, D. Jay, V. Monteón & R. López. 2010. Antimicrobial activity of marine bacteria isolated from Gulf of México. *Revista Peruana de Biología*, 17(2): 23-236.
- Chelossi, E., M. Milanese, A. Milano, R. Pronzato & G. Riccardi. 2004. Characterization and antimicrobial activity of epibiotic bacteria from *Petrosia ficiformis* (Porifera, Demospongiae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 309: 21-33.
- Contreras, F. 1985. Las Lagunas Costeras Mexicanas. *Centro de Ecodesarrollo y Secretaría de Pesca, México*, 253 p.
- Debitus, C., G. Guella, I. Mancini, J. Waikedre, J. Guemas, J. Nicolas & F. Pietra. 1998. Quinolones from a bacterium and tyrosine metabolites from its host sponge, *Suberea creba* from the Coral Sea. *Journal of Marine Biotechnology*, 6: 136-141.
- Devi, P., S. Wahidullah, C. Rodrigues & L. Souza. 2010. The Sponge-associated bacteria bacterium *Bacillus licheniformis* SAB1: a source of antimicrobial compounds. *Marine Drugs*, 8: 1203-1212.
- Distel, D. L., E. F. DeLong & J.B. Waterbury. 2001. Phylogenetic characterization and in situ localization of the bacterial symbiont of shipworms (Teredinidae:

- Bivalvia) by using 16S rRNA sequence analysis and oligodeoxynucleotide probe hybridization. *Applied Environmental Microbiology*, 57: 2376–2382.
- Doshida, J., H. Hasegawa, H. Onuki & N. Shimidzu. 1996. Exophilin A, a new antibiotic from a marine microorganism *Exophiala pisciphila*. *The Journal of Antibiotics*, 49: 1105–1109.
- Dosse, G. 1939. Bakterien und Pilzbefunde sowie pathologische und Fäulnisvorgänge in Meeres- und Süßwasserschwämmen. Untersuchungen im Zusammenhang mit dem gegenwärtigen Sterben der Badeschwämme in Westindien. *Zeitschrift für Parasitenkunde-parasitology Research*, 11: 331-356.
- Elyakov, G. B., T. Kuznetsova, Mikhailov, I. Maltsev, V. Voinov & S. A. Fedoreyev. 1991. Brominated diphenyl ethers from a marine bacterium associated with the sponge *Dysidea* sp. *Experientia*, 47: 632–633.
- Elyakov, G., T. Kuznetsova & V. Mikhailo. 1996. From chemistry of marine natural products to marine technologies: Research at the Pacific Institute of Bioorganic Chemistry. *Marine Technology Society Journal*, 30: 21-28.
- Enticknap, J., M. Kelly, O. Peraud & R. Hill. 2006. Characterization of a culturable alphaproteobacterial symbiont common to many marine sponges and evidence for vertical transmission via sponge larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, 27(5): 3724-3732.
- Espinoza, G., M. Llinas & E. Amador. 1979. Bentos. Estudio ecológico comparativo de las lagunas de Enfermería y Balandra y el canal de mareas Zacatecas, en

- la Bahía de La Paz, B.C.S. México. En: *Memorias, Quinta Reunión de CIBCASIO*, La Paz, B.C.S., México, noviembre 1979, sin paginación.
- Faulkner, J., M. Unson & A. Bewley. 1994. The chemistry of some sponges and their symbionts. *Pure and Applied Chemistry*, 66(10): 1983-1990.
- Feby, A. & S. Nair, 2010. Sponge-associated bacteria of Lakshadweep coral reefs, India: resource for extracellular hydrolytic enzymes. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 1: 330-337.
- Fenical, W. & P. Jensen. 1993. Marine microorganisms: a new biomedical resource, 43-54. En: Attaway, D. & O. Zaborsky (Eds) *Marine Biotechnology*, Plenum Press, New York, 455 p.
- Friedrich, A., I. Fischer, P. Proksch, J. Hacker & U. Hentschel. 2001. Temporal variation of the microbial community associated with the Mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*. *Microbiology Ecology*, 38: 105–113.
- Garateix, A. 2005. El mar: fuente de nuevos fármacos. *Elementos: Ciencia y Cultura*, 12(58): 39-47.
- González-Acosta, B. 2006. *Caracterización de comunidades bacterianas en sedimentos marinos*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, México, 120 p.
- Hentschel, U., M. Schmid, M. Wagner, L. Fieseler, C. Gernert & J. Hacker. 2001. Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina*

cavernicola. *Federation of European Microbiological Society Microbiology Ecology*, 35: 305-312.

Hentschel, U., J. Hopke, M. Horn, A. Friedrich, M. Wagner, J. Hacker & B. Moore.

2002. Molecular evidence for a microbial community in sponges from different oceans. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 4331-4440.

Hentschel, U., L. Fieseler, M. Wehrl, C. Gernert, M. Steinert, M. Horn & J. Hacker.

2003. Microbial diversity of marine sponges, 59-88. En: Müller, W. (Ed) *Molecular marine biology of sponges*. Springer-Verlag, Heidelberg, 1203 p.

Hill, R. 2004. Microbes from marine sponges: a treasure trove of biodiversity for

natural products discovery, 177-190. En Bull, A. (Ed.) *Microbial diversity and bioprospecting*. ASM Press, Washington D.C., 564 p.

Imhoff, J. & H. Trüper. 1976. Marine sponges as habitats of anaerobic phototrophic

bacteria. *Microbial Ecology*, 3: 1-9.

Imhoff, J. 2011. Functional gene sequences studies of pure cultures are the basis

of systematic studies of environmental communities of phototrophic bacteria and their species-specific analyses. *The Bulletin of BISMIS*, 2(2): 107-115.

Islam, T. 2007. Disruption of ultrastructure and cytoskeletal network is involved

with biocontrol of damping-off pathogen *Aphanomyces cochlioides* by *Lysobacter* sp. Strain SB-K88. *Biological Control*, 43(3): 312-321.

Kämpfer, P. 2012. Systematics of procaryotes: the state of the art. *Antonie van*

Leeuwenhoek, 101: 3-11.

- Kanagasabhpathy, M., K. Nagata, Y. Fujita, T. Tamura, H. Okamura & S. Nagata. 2004. Antibacterial activity of the marine sponge *Psammaplysilla purpurea*: importance of its surface-associated bacteria. *Oceans '04*, 14: 345-352.
- Kanagasabhpathy, M., H. Sasaki, K. Nakajima, K. Nagata & S. Nagata. 2005. Inhibitory activities of surface associated bacteria isolated from the marine sponge *Pseudoceratina purpurea*. *Microbes and Environments*, 20(3): 178-185.
- Ki, J., W. Zhang & P. Quian. 2009. Discovery of marine *Bacillus* species by 16S rRNA and *rpoB* comparisons and their usefulness for species identification. *Journal of Microbiological Methods*, 77: 48-57.
- Lafi, F., M. Garson, & J. Fuerst. 2005. Culturable bacterial symbionts isolated from two distinct sponge species (*Pseudoceratina clavata* and *Rhabdastrella globostellata*) from the Great Barrier Reef display similar phylogenetic diversity. *Microbial Ecology*, 50: 213-220.
- Lee, Y.K., J. Lee & H.K. Lee. 2001. Microbial Symbiosis in Marine Sponges. *Journal of Microbiology*, 39(4): 254-264.
- Lee, O. & P. Qian. 2004. Potential control of bacterial epibiosis on the surface of the sponge *Mycale adhaerens*. *Aquatic Microbial Ecology*, 34: 11-21.
- Lee, O., S. Lau & P. Qian. 2006. Defense against epibiosis in the sponge *Mycale adhaerens*: modulating the bacterial community associated with its surface. *Aquatic Microbial Ecology*, 43: 55-65.

- Lee, O., Y. Wong & P. Qian. 2009. Inter- and Intraspecific variations of bacterial communities associated with marine sponges from San Juan Island, Washington. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(11): 3513-3521.
- Levi, C. & P. Levi. 1965. Populations bacteriennes darts les Eponges. *Journal of Microscopy*, 4: 151-156.
- Li, Z. & Y. Liu. 2006. Marine sponge *Craniella australiensis*-associated bacterial diversity revelation based on 16S rDNA library and biologically active Actinomycetes screening, phylogenetic analysis. *Letters in Applied Microbiology*, 43: 410-416.
- Li, Z., L. He & X. Miao. 2007. Caultivable bacterial community from South China Sea Sponge as revealed by DGGE fingerprinting and 16S rDNA phylogenetic analysis. *Current Microbiology*, 55: 465-472.
- Li, Z. 2009. Advances in marine microbial symbionts in the China Sea and related pharmaceutical metabolites. *Marine Drugs*, 7: 113-129.
- Liu, R., C. Cui, L. Duan, Q. Gu & W. Zhu. 2005. Potent *in Vitro* anticancer activity of metacycloprodigiosin and undecylprodigiosin from a sponge-derived actinomycete *Saccharopolyspora* sp nov. *Archives of Pharmacal Research*, 28: 1341–1344.
- López, J., P. McCarthy, K. Janda, R. Willoughby & S. Pomponi, 1999. Molecular techniques reveal wide phyletic diversity of heterotrophic microbes associated with *Discodermia* spp. (Porifera: Demospongia). *Memoirs of the Queensland Museum*, 44: 329-341.

- Ludwig, W. & K. Schleifer. 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 15: 155-173.
- Lugioyo, G., D. Cabrera, M. Miravet, R. Núñez, Y. Delgado, H. Cabrera & J. Martí. 2003. Identificación y detección de la actividad antimicrobiana de cepas de bacterias aisladas de la zona exclusiva económica del sur de Cuba. *Serie Oceanológica*, 1: 59-67.
- Madigan, M., J. Martinko & J. Parker. 2006. *Brock: Biología de los Microorganismos*. Pearson Prentice Hall, España, 1011p.
- Matsunaga, S., P. Liu, C. Celatka, J. Panek & N.Fusetani. 1999 Relative and Absolute Stereochemistry of Mycalolides, Bioactive Macrolides from the Marine Sponge *Mycale agellanica*. *Journal of the American Chemical Society*, 23: 5605-5606.
- McMichael, A.J. 2000. La salud y el entorno urbano en un mundo cada vez más globalizado: problemas para los países en desarrollo. *Bull World Health Organization*, 78(9): 1117-1126.
- Meyer, B. & J. Kuever. 2007. Phylogenetic diversity and spatial distribution of the microbial community associated with the Caribbean deep-water sponge *Polymastia corticata* by 16S rRNA, aprA, and amoA gene analysis. *Microbial Ecology*, 56: 306–321.
- Mohamed, N., V. Rao, M. Hamann, M. Kelly & R. Hill. 2008a. Monitoring bacterial diversity of the marine sponge *Ircinia strobilina* upon transfer into aquaculture. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(13): 4133-4143.

- Mohamed, N., A. Colman, Y. Tal & R. Hill. 2008b. Diversity and expression of nitrogen fixation genes in bacterial symbionts of marine sponges. *Environmental Microbiology*, 10(11): 2910-2921.
- Mohamed, N., E. Cicirelli, J. Kan, F. Cheng, C. Fuqua & R. Hill. 2008c. Diversity and quorum-sensing signal production of Proteobacteria associated with marine sponges. *Environmental Microbiology*, 10(1): 75-86.
- Muscholl-Silberhorn, A., A. Thiel & J. Imhoff. 2007. Abundance and Bioactivity of Cultured Sponge-Associated Bacteria from the Mediterranean Sea. *Microbial Ecology*, 55: 94-106.
- NCCLS (National committee for clinical laboratory standards). 1993. Performance standards of antimicrobial susceptibility test, approved standard. Sexta Edición. EUA. M2-A5.
- Obeso, M., Jiménez, A. & S. Troyo. 1993. Modelación de la marea en la Bahía de La Paz, B. C. S. *Investigaciones Marinas CICIMAR*, 8(1): 13-22.
- Olmos, J. 2004. Caracterización Molecular e Identificación Filogenética de Microorganismos marinos. En: *X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*.
- Olsen, G. & C. Woese. 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 7: 113-123.
- Otero, J. 2011. *Aislamiento, selección e identificación de Actinomicetos, bacterias fotosintéticas no sulfurosas y bacterias ácido lácticas con potencial*

- biofertilizante, a partir de suelos asociados al cultivo de plátano en la costa Atlántica Colombiana*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Colombiana, 365 p.
- Qian, P., S. Dobretsov, H. Dahms & J. Pawlik. 2006. Antifouling activity and microbial diversity of two generic sponges *Callyspongia* spp. from Hong Kong and the Bahamas. *Marine Ecology Progress Series*, 324: 151-165.
- Radjasa, O. 2007. Antibacterial activity of sponge associated bacteria isolated from north Java Sea. *Journal of Coastal Development*, 10(3): 143-150.
- Radjasa, O. 2008. Growth inhibition of medically antibiotic resistant bacteria by sponge-associated bacteria. *Journal of Coastal Development*, 11(2): 75-80.
- Remya, T., D. Kavlekar & P. LokaBharathi. 2010. Marine Drugs from Sponge-Microbe Association- A Review. *Marine Drugs*, 8: 1417-1468.
- Rodríguez, E., M. Gamboa, F. Hernández & J. García. 2006. *Bacteriología general: principios y prácticas de laboratorio*. Editorial EUCR, Costa Rica, 370 p.
- Romanenko, L., M. Uchino, N. Tanaka, G. M. Frolova & V. Mikhailov. 2012. *Lysobacter spongiicola* sp. nov., isolated from deep-sea sponge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(2): 370-374.
- Sabarathnam, B., A. Manilal, S. Sujith, S. Seghal, J. Selvin, A. Thomas & R. Ravji. 2010. Role of sponge associated actinomycetes in the marine phosphorous biogeochemical cycles. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science*, 8(3): 253-256.

- Sambrook J. & D.W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 879 p.
- Santavy, D., P. Willenz & R. Colwell. 1990. Phenotypic study of bacteria associated with the Caribbean Sclerosponge, *Ceratoporella nicholsoni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6): 1750- 1762.
- Santos, O., P. Pontes, J. Santos, G. Muricy, M. Giambiagi-deMarval & M. Laport. 2010. Isolation, characterization and phylogeny of sponge-associated bacteria with antimicrobial activities from Brazil. *Research in Microbiology*, 29: 1-9.
- Sara, M. 1971. Ultrastructural aspects of the symbiosis between two species of the genus *Aphanocapsa* (Cyanophyceae) and *Ircinia variabilis* (Demospongiae). *Marine Biology*, 11: 214–221.
- Schloss, P. & J. Handelsman. 2005. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 1501-1506.
- Selvin, J., R. Gandhimathi, G. Seghal, S. Kiran, P. Shanmugha, T. Rajeetha & T. Hema. 2009. Culturable heterotrophic bacteria from the marine sponge *Dendrilla nigra*: isolation and phylogenetic diversity of actinobacteria. *Helgoland Marine Research*, 63: 239-247.
- Sherr, E. & B. Sherr. 2000. Marine microbes: an overview, 13-46. En: Kirchman, D. L. (Ed) *Microbial Ecology of the Oceans*. Wiley-Liss, New York, 549 p.

- Shieh, W. & Y. Lin. 1994. Association of heterotrophic nitrogen-fixing bacteria with a marine sponge *Halichondria* sp. *Bulletin of Marine Science*, 54: 557-564.
- Sipkema, D. & H. Blanch. 2010. Spatial distribution of bacteria associated with the marine sponge *Tethya californiana*. *Marine Biology*, 157: 627-638.
- Stackebrandt, E. & J. Ebers. 2006. Taxonomic parameters revisited: Tarnished gold standards. *Microbiology Today*, 33: 152-155.
- Stierle, A. C., J. Cardellina & F. L. Singleton. 1988. A marine *Micrococcus* produces metabolites ascribed to the sponge *Tedania ignis*. *Experientia*, 44: 1021-1029.
- Taylor, M., R. Radax, D. Steger & M. Wagner. 2007. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71: 295-347.
- Teasdale, M., J. Liu, J. Wallace, F. Akhlagui & D. Rowley. 2009. Secondary metabolites produced by the marine bacterium *Halobacillus salinus* that inhibit *quorum sensing*-controlled phenotypes in Gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(3): 567-572.
- Thakur, N. & A. Anil. 2000. Antibacterial activity of the sponge *Ircinia ramosa*: importance of its surface-associated bacteria. *Journal of Chemical Ecology*, 26: 57-71.
- Thakur, N., A. Anil & W. Müller. 2004. Culturable epibacteria of the marine sponge *Ircinia fusca*: temporal variations and their possible role in epibacterial defense of the host. *Aquatic Microbial Ecology*, 37: 295-304.

- Thiel, V., S. Neulinger, T. Staufenberg, R. Schmaljohann & J. Imhoff. 2007. Spatial distribution of sponge-associated bacteria in the Mediterranean sponge *Tethya aurantium*. *FEMS Microbiology Ecology*, 59: 47-63.
- Toledo, G., W. Green, R. Gonzales, L. Christoffersen, M. Podar, H. Chang, T. Hemscheidt, H. Trapido, J. Short, R. Bidigare & E. Mathur. 2006. High Throughput Cultivation for Isolation of Novel Marine Microorganisms. *Oceanography*, 19(2): 120-125.
- Unson, M. & D. Faulkner. 1993. Cyanobacterial symbiont biosynthesis of chlorinated metabolites from *Dysidea herbacea* (Porifera). *Experientia*, 49: 349-353.
- Unson, M., N. Holland & D. Faulkner. 1994. A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue. *Marine Biology*, 119: 1-11.
- Vacelet, J. 1971. Étude en microscopie électronique de l'association entre une cyanophycée chroococcale et une éponge du genre *Verongia*. *Journal de Microscopie*, 12: 363-380.
- Vacelet, J. 1975. Étude en microscopie électronique de l'association entre bactéries et spongiaires du genre *Verongia* (Dictyoceratida). *Journal of Microscopy-Paris*, 23: 271-288.

- Vacelet, J. & C. Donadey. 1977. Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 30: 301-314.
- Vázquez, M., I. Sánchez & A. Ortega-Rubio. 2011. Maricultura en la Bahía de la Paz, B.C.S., México: impacto socioeconómico de los cultivos de atún y camarón. *Estudios Sociales*, 19(37): 119-126.
- Villaseñor, A. 1979. Distribución vertical de temperatura, salinidad y oxígeno disuelto en la Bahía de La Paz, B.C.S., durante la primavera de 1976. *California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports*, 20: 146-149.
- Wang, G., S. Yoon & E. Lefait. 2008. Microbial communities associated with the invasive Hawaiian sponge *Mycale armata*. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 8: 1-4.
- Wilkinson, C. R. 1978a. Microbial associations in sponges. I. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges. *Marine Biology*, 49: 161–167.
- Wilkinson, C. R. 1978b. Microbial associations in sponges. II. Numerical analysis of sponge and water bacterial populations. *Marine Biology*, 49: 169–176.
- Wilkinson, C. R. 1978c. Microbial associations in sponges. III. Ultrastructure of the in situ associations in coral reef sponges. *Marine Biology*, 49: 177–185.
- Wilkinson, C.R. & P. Fay. 1979. Nitrogen fixation in coral reef sponges with symbiotic cyanobacteria. *Nature*, 279: 527–529.

- Wilkinson, C.R. & R. Garrone. 1980. Nutrition of marine sponges, 157–161. En: Smith D. & Y. Tiffon (Eds.), *Nutrition in the lower metazoan*. Pergamon Press Oxford, United Kingdom, 188 p.
- Wilkinson, C. R., M. Nowak, B. Austin & R.R. Colwell. 1981. Specificity of bacterial symbionts in Mediterranean and Great Barrier Reef sponges. *Microbial Ecology*, 7: 13–21.
- Webster, N. & R. Hill. 2001. The culturable microbial community of the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile* is dominated by an α -Proteobacterium. *Marine Biology*, 138: 843-851.
- Webster, N., K. Wilson, L. Blackall & R.T. Hill. 2001. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1): 434-444.
- Webster, N., R. Cobb & A. Negri. 2008. Temperature thresholds for bacterial symbiosis with a sponge. *International Society for Microbial Ecology Journal*, 2: 830-842.
- Xin, Z.H., W.M. Zhu, Q.Q. Gu, L.D. Fang & C.B. Cui. 2005. A new cytotoxic compound from *Penicillium auratiogriseum*, symbiotic or epiphytic fungus of sponge *Mycale plumose*. *Chinese Chemical Letters*, 16: 1227–1229.
- Xin, Z.H., Y. Fang, L. Du, T. Zhu, L. Duan, J. Chen, Q. Gu & W. Zhu. 2007. Aurantiomides A C, quinazoline alkaloids from the sponge-derived fungus *Penicillium auratiogriseum* SP0-19. *Journal of Natural Products*, 70: 853–855.

- Yang, L., R. Tan, Q. Wang, W. Huang & Y. Yin. 2002. Antifungal cyclopeptides from *Halobacillus litoralis* YS3106 of marine origin. *Tetrahedron letters*, 43(37): 6545-6548.
- Yang, Z. & Z. Li. 2012. Spatial distribution of prokaryotic symbionts and ammoxidation, denitrifer bacteria in marine sponge *Astrosclera willeyana*. *Scientific Reports*, 2: 528.
- Zheng, L., X. Han, H. Chen, W. Lin & X. Yan. 2005. Marine bacteria associated with marine macroorganisms: the potential antimicrobial resources. *Annals of Microbiology*, 55(2): 119-124.
- Zhi, X., W. Zhao, W. Li & G. Zhao. 2012. Prokaryotic systematics in the genomics era. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101: 21-34.
- Zuber, P., M. Nakano & M. Marahiel. 1993. Peptide antibiotics, 897-916. En: Sonenshein, A., J. Hoch & R. Losick (Eds) *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria. *American Society for Microbiology*, Washington, D.C., 439 p.

ANEXO I Secuencias parciales del ADNr 16S

Cepa My0101

Secuencia:

TTTACCTTTCCTGGGGCAGCATTGGGTCCTTGGGGCCGCCGGGGATTGACGGAGAGGGGAGGACGCCTTGAATCACC
CCCCTGGTGGGGGAAAACCTGCGAAGCTTACGCTCATACCGGGACGAACTACGGGTGAAAGCCTGGGACCTTCTGGCCT
GGCTTTGATAGATCAGTCGACGCCGGACTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAAGCAACAATCCGCAACTGGT
CAGAGAGGATGATCCCCACACTGGAACCTAAGACGGGTGGGGAATCCTACAGGATGCGGGCAACCAGGAATTTGGACT
GTGGGCCCAAGCCGGATCCCCCTTGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTATAGGGGACTAA
AAGCCATGGGCTAATACCCTGTGGTTCTGACGGTACCCAGGAATAAACCCTCCGGCTAAATTCGTGCCAGTAACCGCTGT
AATACCAAGGGTGTGACGCTTGTCTGAAATTACTGGGCTTAAAGCGTGCCTAGGTGGTGAGATAAGTCTTTCTGTGAAA
CCCCTGGGCTGACCCTGGCTATGGCATGTGGAGACTGGCTGACTGGAGGGCCGTAGAAGGTAGAGGAGTTCCGGGCG
TTCCCGAAATGCGTTAATTCTGAGAGTTTTATCCCGTGGCGAAGGCCGACTACCTGGACCAGCACGGAGTCTGAGGCAC
AAAGCATGGAGGACCAATCATGATGTAGATATCCTATATAGTCGACGCCCCAAACGATGCAAACTAGTACGTTGGGTGC
ACATAGGTACCAATATCAAATTCTAACGCATTGACTTCGCCCCCTCGCAAAGTGCAGTGCAGAACTGATAACTACAAA
GAATTGACTAGGAGCGCTGCTCAAGCCTTGAAGTTATGGTGGTTAACTCGGATGCCAGCTGCATCACCTTCACCTG
ACGCTGACTGACATCCGCTAACTTCCCAGAGATCAGCACCGGTCGCCCTACGATGTAGCTGAGATAAATCTCGTGACTA
GCCTGACTCTCTCGCTCGTACTGCAGAGATTGGCTAAGTCTCACGAGCTACTACCTGATCTAGTAGCAACTCCGAGT
AGTAGGTAACGCTCATGGAGACCTCTAGACACGGAAGCAACAGGTGCGTAATTACCTCATACT

Cepa My0102

Secuencia:

TGCAGTCGAACGGCAGCGGGTCTTCGGGATGCCGGCAGTGGCGGACGGGTGAGGAATGCGTCGGAATCTGCCTCT
TTGTGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATACGACCTACGGGTGAAAGCCGGGGACCTTCGGGCCTG
GCGCAGAGAGATGAGCCGACGCCGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAAGCGACGATCCGTAGCTGGT
CTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGAC
AATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTGGGGAAG
AAAAGCCATGGGCTAATACCCTGTGGTTCTGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCCGGCTAATTCGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGAAGGGTGAACGCTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGTGGTTTGTAAAGTCTGATGTGA
AAGCCCTGGGCTAACCTGGGAATGGCATTGAAACTGGCTGACTGGAGTGCAGTGCAGGAGGAGTGGAAATCCCGGT
GTAGCAGTGAATGCGTAGATATCGGGAGGAACATCCGTGGCGAAGGCCGACTACCTGGACCAGCACTGACACTGAGGC
ACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGC
ACTTAGGCACTCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCTGGGAAGTACGGTGCAGAACTGAAACTCAAAGGA
ATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGCAGAACCTTACCTGGCCTTGACA
TCCACGGAAGTCCCAGAGAATGGGCGGGTGCCTTTCGGGAACCGTGCAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTC
GTGTCGTGAGAATGTTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTAGTGCAGCACGTAATGGTGGAACT
CTAGAGACCGCGTGAACCCGGAAGAAAGTGGGGATGACGTGATCATCATGTCTACGCAAGGGCTACCCACGTA
CCTACATGTGGGACGAGGTCTGCCAACCCGCTAGGGCGACCAATTCAGAAAAACCCCAATCTCG

Cepa My0103

Secuencia:

GCAGTCGAACGCTGAAGCTGGGGGCTTGCCCTGGGTGGATGAGTGGCGAAGGGGTGAGTAATACGTGAGTCCCTGCC
CTTACTCTGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACTGGATATGACCTCCTGTGCGATGGTGGGGGGTGGAAAGG
GTTTGTACTGGTTGTGGATGGGCTCACGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAACGCGACCACGGGTA
GCCGGCCTGAGAGGGTACCAGCCACACTGGGACTGAGAAACGGCCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAGAGGGGAAT
ATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATGCACCGACGCCGCTGAGGGATGACGGACGTCGTGTTGTAACATCTTTCAGA
ACAAAAGAAGCAAAAGTGACGGTCCGTGCAGAAAGAAGCTCGGCTAACTCCATGCCACCAGCCGCGGTAATACGCGCGG
CGTTGCCCGGAATTATAATTATTGAAAGAGCTGAGCTCGGCTTGTGTTGTCTGCTGTGCTGCCCGACGCTCAACCTAAC
GCGTGGAGTGGATCCCGGCCGGCTAGAGTGAAGTACGGGAGACTGAGAGCTCATCGCGTGGTGTAGAAGTGAAGTTGA
TATCATGATGAACCCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGAGCTGTTACTGACACTGAGCAGCGTAGCATGGGTAGAGAAC
ACGATTAGGATACCCTGGTGGTGCATGCCATAAAGTAAATGCACTAGGTGTGGGAGGACATTCACACGATGTTCCGGCTA
CGGCGCCGGACTCAATCACCTGTCACATGCCTGCGGGAGTACCCGCTACAGCCGCTAGACTCAAAGGTAATAGTACGT
AGAGCCCGCACACGCACGTGATCATGCTGGTTTCAAGTTCGATGCAACGCGAAGATCATTACCATTGCTTCGCTGCAACTG
GACCTCTGCAGGGCATGGAGTTTCTCTTTGCTACTCGTGTGAAGGTAGTGTACTCGCTGTGCGGTGACTAGTGTCTGT
CATGCTTGGTGTGAGTACGCTACGGTGCAGCACCTAGTGGCTACGCTCGCTGCTACAGTACAGGACGGTAATCGTA
TGCAGACTGACACTGGACCTAGTCCGATCCGACGTGAGGATGCACGTGCAAAATCAATGTGCCAGGTTACGGTTCACCC
TTACTCTCTAGTCAGTTAGCTCTATGCATGCATCGATGCAGACGGAAGGCTCGA

Cepa My0104

Secuencia:

TACATGCAAGTCGAGCGAACTGATTTAGAAGCCTTGCTTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG
CAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACATTTTCTCTTGCATAAGAGAAAAT
TGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGG
CAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAA
AACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTAACTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAAGCCACGGCTAA
CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGGC
GTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGAAAAGTGGGAACTTGAAGTGCAGAAGA
GAAAAGCGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGT
CTGTAACCTGACGCTGAGGCGGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT
AGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTGTAGTCTGACGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGGAGTACGGTC
GCAAGACTGAACTCAAGGAATTGACAGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCAACGCGAAGA
ACCTTACCAGTCTTGACATCCTCTGACACTCTAGAGATAGAGCGTCCCTTCGGGGACAGAGTACAGGTGGGTGCATG
GTGTCGTCAGCTCGTGTCTGGAGATGTTGGGGTAGTCCCGCACGAGCGCACCATGATCTAGTGCAGCATAGTTGCA
CTCTAGTACTGCGTGACACGAGAAAATGGATACTCAATCATCATGCCTATGACTGGCTACCATGTCTCATGATGTACAA
GCGTCAGACTGCAGGTCAGTCAACTCATGAGAACATCTCTCTAG

Cepa My0105

Secuencia:

CATGCAAGTTCGAACGGATCCTTTCCGGGATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAACCGCTGGGAAGCTACCTTGTGGTAGGG
AAAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCCTATGAGCCCTATGGGGGAGAGATTTATCGCCATGAGATGTGCCCGCGTTA
GATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCGACGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGG
ACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGACAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCA
TGCCCGTGAAGTGTGACGGCCTTAGGGTTGTAAGCTCTTTCAGCAGTGAAGATAATGACATTAAGTGCAGAAGAAGC
CCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGTA
CGTAGGCGGACTGATCAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGGAAGTGCCTTTGATACTGTGAGTCTTGAGA
TCGAGAGAGGTGAGTGGAACTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGC
TCACTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
AAACGATGAATGCTAGTTGTGAGGTAGCTTGTATTTGGTGACGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTAC
GGTCGCAAGATTAAGTCAAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCAACG
CGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATTTGGCGCTACAACCGGAGACGGTTGGGTTCCCTTTCCGGGACGCTCAGGACAG
GTGCTGCATGGCTGTGCTGAGTGTGCTGAGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCACGAGCGCATCCTCGCCCTAGTGG
CAGCATTAGTTGGGCACTCTAGGGGACTGCGTGATAGCGAGAAGGTGGGGATGACGTGAGTCTCATGGACTACGCTGG
GCTAACACTGCTACATGGCGGACGTGGCACGACTCGCCGAGGGAGCTATCTCAAGCGCTCAATCGAGTGTGACTTGA
CTGAATGATCAGTATCGTACATACCGGATCG

Cepa My0106

Secuencia:

TGCAAGTTCGAAGCGCGGGAAGCGAAGCGGATCCCTTCGGGGTGAAGCTCGTGGAAACGAGCGGCGGACGGGTGAGT
AACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGATCGGAATAACCCCGGGAACCGGGGCTAATGCCGGTAATACTTTTCTTCGC
ATGAAGATAAGTTGAAAGATGGCTTCTCGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAC
GGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAACGATGAAGGT
CTTCGGATCGTAAAGTCTGTTGTGAGGGAAGAACAAGTACCGTGCGAATAGAGCGGTACCTTGACGGTACCTGACGAG
GAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCGGGAATTATTGGGCGTAAA
GCGCGCGCAGGCGGTTCCCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGAAAAGTGGGAACT
TGAGGACAGAAAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAG
GCGACTCTCTGGTCTGTTCTGACGCTGAGGTGCGAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTAACGATGAGTGCTAGTGTAAAGGGCTTCCACCCCTTAGTGCTGAAGTAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGG
GAGTACGGCCGAAGGCTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGGTGGTTAATTGGA
GCAACGCGAGACTTACAGTCTGACATCTGGACTCCTAGAAGAATAGGGATTCCCTCGGGACAAGTACAGGTGGGTGC
ATGTGTCGTGACTCGTGTCTGAGAAAGTGTGGGTTAGTCCGCACGAGCGCACCCCTATCTAGTTGGCAGCATTCAAGTGG
CACTCTAGGTGACTTGCCTGACACGAGAAGGACGGGATACGTCAATCATCATGCCTATGACTGGCTACACGGTCCAT
GAGTGTACAAGCAGGACTCTGCAGGGTTGACAATCCCT

Cepa My0107

Secuencia:

ATGCAGTCGAACGATGATGCCAGCTTGTCTGGGCGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACGTGAGTAACCTGCCCT
TGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACTGGATACTACCTTTACCGCATGGTGGGTGGTGGAAAGGGT
TTACTGGTTTTGGATGGGCTCACGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCG
GCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG
CACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTAGTAGG
GAAGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGC
GCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCCGTTTGTGCGCTCTGCTGTGAAAGCCCCGGGGCTCA
ACCCCGGTCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATG
CGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGCTGTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGG
GAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGGACATTCCACGTTTT
CCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGG
GGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGACATTCACCGGA
CCGCCCCAGAGATGGGGTTCCCTTTGGGGCTGGTGGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGAT
GTTGGGTTAAGTCCCGCACGAGCGCAACCCTCGTTTATGTTGCAGCACGTGATGGTGGGGACTCATAGAGACTGCG
GGTCACTCGGAGAAAGTTGGGATGACGTCAATCATCATGCCCTTATGTCCTGGGCTCAGCATGCTACATGACGGTACA
AGCATGCGAATCTGTGAGGTGGAGCCTAATCCAAAAGCCGGTCTCCAG

Cepa My0108

Secuencia:

CACATGCAAGTCGAACGGATCCTTCGGGATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAAGCTACCTTGTGGTAGGG
AACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCCTATGAGCCCTATGGGGGAAAGATTTATCGCCATGAGATGTGCCCGCGTT
AGATTAGCTAGTTGGTAAGTAATGGCTTACCAAGGCGACGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGG
GACTGAGACAGGCCACACTCCTACGGGAGGCAGCTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCC
ATGCCGCGTGTGTGATGACGGCCTTAGGGTTGTAAGCACTTTTCAGCAGTGAAGATAATGACATTAACCTGCAGAAGA
CCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTGGAATCACTGGGCGTAAAGCGT
ACGTAGGCGGACTGATCAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGCTCAACCCCGGAAGTGCCTTTGATACTGTGAGTCTTGAG
ATCGAGAGAGGTGAGTGAAGTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGG
CTCACTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGATGAATGCTAGTTGTCAGGTAGCTTGTATTTGGTACGCGAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTA
CGGTCGCAAGATTAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAAC
CGCGAACCCTTACCAGCCCTTGACATTTGGCGCTACATCGGAGACCCGATGGTCCCTTCGGGGACGTCAGGAGG
TGCTGCATGGCTGTGCTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGT
GCCAGCATTAGTGGGCACTCTAGGGGGGACTGCCCGGTGATAAGCCGAGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATG
GTCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACATGGCGGTGACAGTGGGCAGGCCAACCTCGCGAGAAGGAGCTAATC
TCCGAAGCGGTCTCAGTTCGTATGTTCTGCCACTCGAGACATGAGTGTATCGCTAGTATCCGGTACAGACAAGTGAAC
GTCGGGTTGATT

Cepa My0109

Secuencia:

ATGCAGTCGAACGCTGAAGCACCAGCTTGTCTGGTGTGGATGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACGTGAGTAACCTGCC
CTTGACTCTGGGATAAGCCCGGAAACTGGGTCTAATACTGGATGCTACATGTCACCGCATGGTGGTGTGTGGAAAGG
GTTTACTGGTCTTGGATGGGCTCACGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGC
CGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
TGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTAGCAG
GGAAGAAGCCACAAGTACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
GCGCAAGCGTTGTCGGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTCTGCTGTGAAAGCCCCGGGGCT
TAACCCCGGGTGTGAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAA
TGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCTGTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATG
GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGGACATTCCACGTTT
TTCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGG
GGGCCCCCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGACATATACCGG
ATCGTTCCAGAGATGGTTCTTCCCTTTGGGGTCCGTTATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGAT
GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTATGTCAGCACGGTGTGGTGGGGACCTCATGGGAGACT
CGGGGCTCACTCGGAGAAGGGTGGGGATGACGTCAATCATCATGCCCTTATTGTCTTGGGCTCAGCATGCTACA
TGTCGTACAAGCATGCCAATCTGTGAGGTTGAGCCTATCCAAAAGCTGTCTCAAGTCTCGGAATGGAAGGGCTGC

Cepa My0110

Secuencia:

GTCGAGCGGAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGG
AAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATRATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGAC
CTTCGGGCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATC
CCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACAGGTCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
GAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTT
CAGTCGTGAGGAAGTRGTGTAGTTAATAGCTGCATTATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGC
CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAA
GTCAGATGTGAAAGCCCCGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAG
AATTTAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGCCCCCTGGACAGATACTG
ACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGG
AGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATAAA
ACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTA
CTCTTGACATCCAGAGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGCA
GCTCGTGTGTAAATGTTGGGTTAGTCCCGCAACGAGCGCACCCCTTATCCTTGTTCAGCAGGAGTATGTCGGAACTCC
AGAGACTGCCGGTGATAACCCGGAGGAGTTGGGGACGMASGTCARTCATCATGG

Cepa My0111

Secuencia:

GCAGTGAACGGATCCTTCGGGATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAAGCTACCTTGTGGTAGGGAACAAC
AGTTGAAAACGACTGCTAATACCCTATGAGCCCTATGGGGGAAAGATTTATCGCCATGAGATGTGCCCGCTTAGATTA
GCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCGACGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTG
AGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCC
CGGTGTGTGATGACGGCCTTAGGTTGTAAGCACTTTCAGCAGTGAAGATAATGACATTAAGTGCAGAAGAAGCCCCG
GCTAATTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGTACGTA
GGCGGACTGATCAGTCAGGGGTGAAATCCCCGGGGCTCAACCCCGGAAGTGCCTTTGATACTGTCAGTCTTGAGATCGA
GAGAGGTGAGTGGAACTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTCAC
TGGCTCGATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAC
GATGAATGCTAGTTGTCAGGTAGCTTGTATTTGGTGACGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCTGGGGAGTACGGTC
GCAAGATTAAGCACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGCA
GAACCTTACCAGCCCTTGACATTTGGCGCTACATCCGGGAGACCGATGGTTCCCTTCGGGGACGTCAGGACAGTGCTG
CATGGCTCGTCACTCGTGTGCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCAGCAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCAGC
ATTTAGTGGGCACCTAGGGGACTGCCGTTGATAGCGAGAAAAGTGGGGGATGACGTCAGTCCCTCATGCCCTTACGGC
TGGCTAACACAGTGTACATGCGGTGACAGTGGCAGCGAACCTCGCGGAAGGAAGCCTAATCTCAAGCGTCTCCAGT
CGATGTCCTGCAACTCGAGCCATGAGTTGAATCGCTAGGTAATCGCGTATCAGACATGTAAGTCCCGC

Cepa My0112

Secuencia:

ATGCAGTGCAGCGAACAGACAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTTGGGTAACCTA
CCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATTTTGAACCGCATGGTTGATAGTAAAG
ATGGTTTTGCTATCACTTATAGATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATA
CGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
GAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAAACGCCGCGTGTAGTGTGAAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGT
TATTAGGGAAGAACATACGTGTAAGTAAGTATGCACGCTTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC
CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGTTTTTTAA
GTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATGGAAACTGGAAAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGG
AATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTGA
CGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGT
GTTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGTGCTGACGCTAACGCATTAAGCAGTCCGCTGGGGAGTACGACCCGAAGGTTGAA
ACTAAAAGGAATTCAGGGGACCCGCACAAGCGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCA
AATCTTGACATCCTTTGACAACCTTAGAGATAGAGCCTTCCCTTTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTCG
TCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCGCACGAGCGCACCCCTTAGCTAGTGAATCAATAGTGGCACTCTAGT
GACTGCGTGACACGAGAAGGTGGGGATGACGTCATCATGTCCTATGATGGCCTACACGTCCTCATGGCAATCAGCA
GCAATCCCAGTACGCAATCCATTAG

Cepa My0113

Secuencia:

GCAGTCGAACGGATCCTTCGGGATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAAGCTACCTTGTGGTAGGGAACAAC
AGTTGGAAACGACTGCTAATACCCTATGAGCCCTATGGGGGAAAGATTTATCGCCATGAGATGTGCCCGCCTTAGATTA
GCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCGACGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTG
AGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCC
GCGTGTGTGATGACGGCCTTAGGGTTGTAAGCACTTTCAGCAGTGAAGATAATGACATTAAGTGCAGAAGAAGCCCCG
GCTAAGTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGAATCACTGGGCGTAAAGCGTACGTA
GGCGGACTGATCAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGGAAGTGCCTTTGATACTGTCAGTCTTGAGATCGA
GAGAGGTGAGTGGAACTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCAC
TGGCTCGATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAC
GATGAATGCTAGTTGTCAGGTAGCTTGTCTATTGGTGACGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCTGGGGAGTACGGTC
GCAAGATTAATAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCA
GAACCTTACCAGCCCTTGACATTTGGCGCTACATCGGGAGACCGATGGTTCCCTTCGGGGACGTGAGGACAGGTGCTG
CATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAG
CATTTAGTGGGCACTCTAGGGGACTGCCGTTGATAGCCGAGAAAGTGGGGATGACGTCAAGTCCCTCATGCCCTACGG
GCTGGGCTACACACGTGCTACATGCGTGACAGTGGGCAGCGACCTCGGCGAGAGGAAGCTAATCTCAAGCGATCTCAG
TTCGATGTCCTGCACTCTGAAGACATGATTTGGATTGCTAGTATCCGCGTACCAGCACAGTGGACTCCCGCT

Cepa My0114

Secuencia:

ATGCAGTCGAACGGATCCTTCGGGATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAAGCTACCTTGTGGTAGGGAAC
AACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCCTATGAGCCCTATGGGGGAAAGATTTATCGCCATGAGATGTGCCCGCCTTAGA
TTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCGACGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGAC
TGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATG
CCGCTGTGTGATGACGGCCTTAGGGTTGTAAGCACTTTCAGCAGTGAAGATAATGACATTAAGTGCAGAAGAAGCCC
CGGCTAAGTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGAATCACTGGGCGTAAAGCGTACG
TAGGCGGATTGATAAGTTAGGGGTGAAATCCCGGGGCTTAACCCCGGAAGTGCCTTTGATACTGTCAGTCTTGAGTTCG
AGAGAGGTGAGTGGAACTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCA
CTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAC
CGATGAATGCTAGTTGTCAGGGTGCCTTGCATTTGGTGTGACGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCTGGGGAGTACGGT
CGCAAGATTAATAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGC
AGAACCTTACCAGCCCTTGACATTTGGCGCTACAAGTGGAGACGCTTGGGTTCCCTTCGGGGACGTGAGGACAGTGTCT
GCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGAATGTTGGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGC
AGCATTTAGTGGGCACTCTAGGGGACTGCCGTTGATAAGCGAGAAGTGGGGATGACGTCAAGTCCCTCATGGCCCTAC
GGCTGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTGACATTGGCCAGCGACCCCGGAGGGGAAGCTAATCTCGAAGCGATCTC
AGTCGATGTCCTGCATCGAAGACCTGACTTGAATCGCATGTAATCCCGTACAGATGGACGCGCCGTAT

Cepa My0115

Secuencia:

TGCAGTCGACGGTAAACAGAGAGTAGCTTGTACTCTGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAATATG
CCTTATGGTGGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGCATGATGTCTACGGACCAAAGTGGGGGACCTTCGG
GCCTCACGCCATAAGATTAGCCCAAGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGC
TGGTTTGGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
GCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCAGTAAG
GAGGAAAGGTTAAGTGTAAATAGCACTTAGCTGTGACGTTACTTACAGAAGAAGCACCAGGTAACCTCCGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTAAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGTACGCAGGCGGTTTGTAAAGCGAGAT
GTGAAAGCCCCGGGCTAACCTGGGAAGTGCATTTCAACTGGCAAACACTAGAGTGTGATAGAGGGTGGTAGAATTTCA
GGTGTAGCGGTGAAATCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACCTGGGTCAACACTGACGCTCA
TGTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGTCTACTAGAAAGCTCGG
GTCTTCGGACTTGTGTTTTCAAAGCTAACGCATTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATG
AATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACACTTGAC
ATACAGAGAACTTACCAGAGATGGTTTGGTGCCTTTCGGGAAGTCTGATACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCGTCAGCTCGT
GTTGTGAGAATGTTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTTAGTCCAGCGATTCCGTGCGGACTCTAG
GAGACTGCCGTGAATAAACGAGAAGTGGGGACGAGTCAAGTGCATCATGCCCTACGTGTAGGGCTACACACTGCTACA
TGGCGCATACGGAGTGTGCGACTGCAGGTAAGCGAAATCCACTTAAAG

Cepa My0116

Secuencia:

CTTTTATTTGAGCGGAGCATGAGGGCTTTCGCCCTGGGAAAGAAGGGGGGTAAGGAACCTCTGGGCCGGGAAC
CCTTTTAGAAGCGTAGCGACCGGAGGATGGACCCATAGGGGATAATTATTTTTGCTCTAAATGGGCCCTTGTTAAATGAC
TTTTGCTCACTTCATGGGGGGAAAACGAATAACTCCTATATTTAGGTAAGGGATTACCAACGCGACGATGCGTAGCC
CACCTGAGAGGGGGAAACGGCCACCTTGGGACTGGTACTCTGCCAAAATCCCCCCCAGGCTGCCCGCGAATCTTC
CGCAAAGGACCAAAGTCCGACCGACCAACGCCCGTGGATGAGTAAGGTTTTTTATCCAAAGCTCTGTTGTTATGGAAG
AACACCTGCCGTGCAATAAGGCGGTACCTTGACGGTTGAACCAAAAAACCACGGGTAACATACATGTCTCAGCCTGAT
CAATACCTAGGGGACAAACGTTGTTCCGAATTATTTGGTCTAAAGCGCGTGCCAGCGGTTTTCTTTTATTATGTGTAAG
CCCTTGCTTTCCATTTATGGTCATTTTAATCTCGGGACTTGATTTGATGAGGAAGGCGGAATTTCCCTGTACCGCGAAA
TGCATAATAATTGGAGGAAAACCATGGGTGCATGCGGGTTTTTTGCCGACTACACGACAAAAACACTAAGACTGGGG
GAGCAAATATGATTAGAATACACCGTCTCCTCCCCGTCCACCAAGAGGTGCCCTAGTGTGGGTGGGGTTTTCTATCCT
TTGTATTGTTGCACACACACAAACCCCCCTCCGGGTGGAGTACGCCGCTGTAGAATCCAAACATATATATTAAGCC
CTTCTACGCCTCGACGGGC

Cepa My0117

Secuencia:

TGCAAGTTCGAAGCGGAAGTTTGAAGGAAGCTTGCTCCTCCAAACTCAGCGGCGGACGGGTGAAGTAACACGTGGGCA
ACCTACCTTTAAGAACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATTCATTTTCGCTTATGGCGAGATGTT
GAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTCTAGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGC
AACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
CAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTTCCGGATCGTAAA
GCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTATCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAA
CTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCG
GTTTCCCTAAGTCTGATGTAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGTACAGAAGA
GGAAAGCGGAATTCGAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGT
CTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATG
AGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAAGTGTGCTGACGCTAACGCATTAAGCACTCGCTGGGGAGTACGCCGCA
AGGCTGAACTCAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGTGGAGCATGTGGTTTATTCAAGCACGCGAGAATTAC
AGTCTTGACATCTCTGACACCCTAGAGATAGGCGTTCCCTTCGGGGACAGAGTACAGTGGTGCATGCTGTCTCAGCT
CGGTCTGAAATGTGGTAGTTCCGCACGAGCGCACTGATCTAGTGCCATCATAGTTACACTCTAAGTGACTGCCGTGACA
CCGAGAAGTGGGATGACGTCATACATGCGTATGACCTGGCTAACTGTTCCATGGCATGCAGGACTGAGCTCAGGTGAC
ATCCGGTAGCT

Cepa My0118

Secuencia:

ATGCAAGTCGAGCGGAAGTTGATGGGTAAGCTTGCTCCATTTCTCAGCGGCGGACGGGTGTAAGTAACACGTGGGCA
ACCTGCCCTACAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGTAATACATAGCATCGCATGATGCAACGTT
GAAAGTTGGCCTTTGGTTACCCTGGAAGATGGGGCCGCGGCCATTACTAATTGGTTAAGGAACCGGTTAACCAAG
GCACCATGCCTAACCCAAGTAAAGGGGGTCCGGCACCCCTGGGACTGGAACCCCGCCAAAATCCTACCGGAAGGA
ACAATAAGGAATCTTCCGCCATGGACCAAAGTCTGACCGAACCAACCCCCCTGAATGGAGAAAGGCTTCCGGTCCGAA
AGGTTTTGTTGGTAAGGAAAAAAGTTCCGTTCAACAGGGGGGACCTTGACCGGACCTAACCCGAAAGCCCCGGT
TACTTCTGCCCGCCACCAGCCGTAATTCCGAAGTGAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCGCGG
TCTCTAAGTCTGATGTAAAGCCACGGCTCACCGTGAAGGCCATTGGAACTGGGGACTTGATGCGAGAGGAATGGA
ATTACGGTAGCGTGAATTGCTAAATTGAAGACCATTGCGACGCGCTCCTGTCTGACTGAGCTGAGCGAGCTGGACGA
CGATGATCCTGTAGTCAGCGTACGATAGCTAGGTCGGATCACTATGCTGAGTACTAGACTGCTGATACGACGAGTGACT
CAGATGACGGTCGAAGCATGAGCATGTGTATCGAGCACGCGAGACTACAGTCTGCGCTCGACTGTGATGACGTACTCA
GACGATGCGTGTGCATGTGGTACGTAGTCTGAGTAGTAGTC

Cepa My0119

Secuencia:

TGCAGTTCGAACGGATCCTTCGGGATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGAAGCTACCTTGTGGTAGGGAACAA
CAGTTGGAAACGACTGCTAATACCCTATGAGCCCTATGGGGGAAAGATTTATCGCCATGAGATGTGCCCGCTTAGATT
AGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCGACGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACT
GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGC
CGCGTGTGTGATGACGGCCTTAGGGTTGTAAGCACTTTACGAGTGAAGATAATGACATTAAGTGCAGAAGAAGCCCC
GGCTAATTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGAATCACTGGGCGTAAAGCGTACGT
AGGGCGACTGATCAGTCAGGGGTGAAATCCCAGGGGCTCAACCCCGGAACCTGCCTTTGATACTGTCAGTCTTGAGATCG
AGAGAGGTGAGTGGAACTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCA
CTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
CGATAATGGCTAGTTGTCAGGTAGCTTGTATTGGTGACGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCTGGGGAGTACGGT
CGCAAGATTAATACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGC
AGAACCTTACCAGCCCTTGACATTTGGCGCTACATCGGGAGACCGATGGTCCCTTCGGGGACGTCAGGACAGTGTG
CATGGCTGTCGTGAGCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCAGCA
TTTAGTGGGCACTCTAGGGGGACTGCCGGTGATAAGCGAGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCTCATGACCTACGGCTGG
GCTACACACGTGCTACATTGGCGTGACCGTGGCAGCGACCTCGCAAGGAGCTATC

Cepa My0120

Secuencia:

ACTTGCAGTCTCACGATGATGCCAGCTTGGTGGGATTAGTGGCGAACGGGGGAGTGACACCTGAGTAACCTGCC
CTTAACCTCTGGGATAACCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGAGCGTCCACCGCATGGTGGGTGTTGGAAAGA
TTTATCGGTTTTGGATGGACTCGCGGCCTATCACCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCC
GGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
GCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTTCAGTAG
GGAAGAAGCGAAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGG
TGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGTTTTGTCGCGTCTGTCGTGAAAGTCCGGGGCTT
AACCCCGGATCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAAT
GCGCAGATATCACGAGGAACACCGATGGCGAAAGCAGGTCTCTGGGCTGTAACGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGG
GGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGTTGGGCACTATGATGTGGGGACCATTCCACGGTTT
CCGCGCCGAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGACCTGGGGGAGTACAGCCGCAAAGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACG
GGGGCCCGCACAAGCAGCAGAGCCATGCACGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTGACTCAAGGCTCTGACATG
TTCTCGATACCCGTTAGAGATACTGGCTTTTCCCTTTTACGCGCGGTTACATGTTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGT
GACGCTGAGAAGCTTGGGTTAAGTCCCCTCAACGAGCCCATCCCTCGGTTCCAGTTGGCAATCAACGTCGAGGACGGG
GAACTCATGGGCGAAGTGTCTTGTCTGAACTCTGCAGAACGGTACTGACGACGCTAATTAGTGTGCGCCCTGTAGT
GTCTGGCCTTTACGCGAGTGTACATTGAGCTGTCCAATTGGATCTGGATCTGATGAGGGTGGAAACATATTGCCCAA
AACACTGGAGGTCGTAATCTCTCGTGAGT

Cepa My0121

Secuencia:

ATGCAAGTTCGAGCGGAACGAAGTAACTGAACCTTCGGGGGACGTTAACGGCGTCGAGCGGGGACGGGTGAGTAA
TGCCTGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAATAGCTTCGGCTCAAAGA
GGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGG
CGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGCAGACCGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
CAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTA
GCACTTTTCAGTGTGAGGAAGGCGGTGTAGTTAATAGCTGCATCGTTTACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAAC
TCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGG
TTAGTTAAGTCAAGTGTGAAAGCCCGGGCTCAACCTCGGAAGTGCATTTGAAACTGGCTGACTAGAGTACTGTAGAGG
GGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGAC
AGATACTGACACTCAGATGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGT
CTACTTGAAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCCGAGCTAACGCGTTAAGTAGACGCTGGGGGAGTACGGTCCG
AAGATTAATACTCAATGAATTGACGGGGCCGCACAGCGTGGAGCATGTTGGTTAATTCGATGCACGCGAAGAACCTTAC
TACTCTGACATCAGAGACTAGCAGAGATGCTTGTGCTCGGACTCTGAGACAGTGTGTCATGCTGTCGTGAGCTCGTGTG
TGAATGTTGGTAGTGCACGAGGCAGTATCCTGTGCAGCAGTATGTCGACTCAGGAACTGCGGAAACCGAGAAGGT
GGGAACATCTAGTATCATGCTACGATAGGATACAGTTCATGCGCACAGGCACTCGAAGTGGCAATCCAG

Cepa My0122

Secuencia:

ATGCAAGTCGAGCGGAAGAATGGGAAGCTTGCTCCATTTCTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTG
CCCTACAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGGTAATACATAGCATCGCATGATGCAACGTTGAAAG
TTGGCCTTTGGCTAACACTGTAGGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCCACG
ATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGACGAAGGCCCTTCGGGTCTGAAAGCTC
TGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCCGTCT
CTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGCCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAG
AGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGCCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGT
AACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGT
GCTAGTGTGGGGGGTTCCACCCCTCAGTGCTGAAGTTAACACATTAAGCACTCCGCCTGGGGGAGTACGACCCG
AAGTTGAAACTCAAGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCAGTGAGCATGTGGTTAATTCGAGCAACGCGAGACTTACA
GTCTGACATCTCTGCACTCTAGAGATAGGACGTCCCTCGGGACAGATGACAGTGTGCATGTGTCGTCAGCTCTGTCTG
AGATGTGGGTTAGTCCGACGAGCGCATCTTGATCTAGTTGACAGCATAAGTGTCACTCTAGGACTGCCGTGACACCGAG
ATGTGTTACGACGTCAATCTCATGCGTTAGACTGGCTAACGTTCCATGACGTCAGGTCACACTGAGGTAGCGATCGTAA
GCCGTTCA

Cepa My0123

Secuencia:

ATGCAGTCGAGCGGAGAATGGGAGCTTGCTCCATTTCTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCC
CTACAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGGTAATACATAGCATCGCATGATGCAACGTTGAAAGTT
GGCCTTTGGCTAACACTGTAGGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCCACGAT
GCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG
GGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGACGAAGGCCCTTCGGGTCTGAAAGCTCTG
TTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCCGTCTCT
TAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGCCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGA
GTGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAAGAACACCAGTGCCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTA
ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTG
CTAGTGTGGGGGGTTCCACCCCTCAGTGCTGAAGTTAACACATTAAGCACTCCGCCCTGGGGGAGTACGACCCGCAA
GGTGAAGCTCAAAGGAATGGACCGGGCCCGCACAAAGCAGTGAGCATGTGGTTAATCCGAAGCAACGCGAAGAACC
TACCAGTCTGACATCTGCACTCCTAGAAGATAGGACGTCCCTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGTGTCG
AGCTCGTGTCTGAGATGGTGGTTAAGTCCGCACGAGCGCACCTTGAATCTAGTGGCAGCAATAAGGTGCACTCTAAGT
GACTGCGGACACGAGCAGGTGGGACGAGTCACTCATGCGTAGACCTGGGACTCAACGTTCCAATGACGTACAAGTCA
CACCTGCAGGTGAGCGAATCCATAAAGC

Cepa My0124

Secuencia:

ACATGCAGTCGAACGATGACGGTGGTGCTTGACCCGCTGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTG
CCCTCCACTTCGGGATAACCTCGGGAATCGTGGCTAATACCGGATATGAGCACTCATCGCATGGTGGGTGTTGGAAA
GATTTATCGGTGGGGGATGGACTCGCGCCTATCAGTTTGTGGTGGAGGTGATGGCTACCAAGACGATGACGGGTAG
CCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT
ATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGACGCGACGCCGCTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCCCTTTTCAGT
AGGGAAGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG
GGCGAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTTGTAGGTGGCTTGTGCGCTGCGCGTAAAACCCGAGGC
TCAACCTCGGGCTGCGGTGGGTACGGGACGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGACTGGAACCTCCTGGTGTAGCGGTGAA
ATGCGCAGATATCAGGAAGAACCCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCATTACTGACACTGAGAAGCGAAAGCATG
GGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGGACATTCCACGTTTT
CCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGG
GGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGCTGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAAGCTTACATGCACTGGA
CAGCTGCAGAGATGTGGCTTTCTTTGGGACTGCTGCACAGGTGGTGCATGCTCGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGT
TGCGTTAAGTCCCGAACGAGCGCACCCCTGTTCTATGTGCAGCCACGTGCATGGTGGGTACCTCTACGAACTGCTGG
TCACTTCGGAGCAGTGGGAACGACGTCAAACATACATGCCCTTAGCCTTGGGCTTCAACATGCTCACTGCCTCGG
CAAATGCTCGGAACGTGAGTGAACGAATCCTAAGAGCCCGCTCAGTCTCGGAAATGCGCTCCTGCGACCT

Cepa My0125

Secuencia:

GCAAGTCGAGCGCGGAAGCGAGTGGATCCCTTCGGGGTGAAGCTCGTGAACGAGCGCGGACGGGTGAGTAACA
CGTGGGCAACCTGCCTGTAAGATCGGAATAACCCCGGAAACCGGGCTAATGCCGGTAATACTTTCTTCGCATGA
AGGAAAGTTGAAAGATGGCTTCTTGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAAGTAACGGCT
CACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACCGCGTGAACGATGAAGTCTTC
GGATCGTAAAGTTCTGTTGTAGGGAAGAACAAGTACCGTGCGAATAGAGCGGTACCTTGACGGTACCTAACGAGGAAG
CCCCGGTAACACTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCGGGAATTATTGGGCGTAAAGCG
CGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAACTGGGGAACCTGA
GGACAGAAGAGGAGAGTGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGC
GACTCTGGTCTGTTTCTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGTAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC
CGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGGCTTCCACCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGG
GAGTACGGCCGAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAA
GCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTGGGACACCCTAGAGATAGGGCTTCCCTTCGGGGACCAAGTG
ACAGTGGTGCATGGTGTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTAGTCCCGCAACGAGCGCACCCCTAATCTAGTGCC
AGCATTAGTGGCACTCTAGTACTGCGGTGACAACGGAGGAAGCGGGATGACGTCATCATCATGCCCGTAGACCTG
GGCTACACGTGCCATATTGATGGTCAAAGGCCAGCGAAGCCCGGGGGTGTGA

Cepa My0126

Secuencia:

ATGCAGTCGAACGCTGAAGCACCAGCTTGCTGGTGTGGATGAGTGCCGAACGGGTGAGTAATACGTGAGTAACCTGCC
CTTGACTCTGGGATAAGCCCGGAAACTGGGTCTAATACTGGATGCTACATGTCACCGCATGGTGGTGTGTGGAAAGG
GTTTACTGGTCTTGGATGGGCTCACGGCCTATCAGCTTGTGGTGAAGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGC
CGGCTGAGAGGGTGACCGGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCATGGGGAATAT
TGACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAG
GGAAGAAGCCACAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGTAACACTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGG
GCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTGCTGTGAAAGCCCAGGGCT
TAACCCCGGGTGTGACGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAA
TGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCTGTTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATG
GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGACATTCCACGTTT
TCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTCCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGG
GGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGG
ATCCGTTCCAGAGATGGGTTCTTCCCTTTGGGGTCCGATACAGGTGGTGCATGGTGTGTCGTCAGCTGTGTCGTGAGAT
GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTCATGTTGCAGCACGTGATGGTGGGACTCATGGAAACTGC
CTGGTACCTCGAAGTAGGTGGATGACGTCAATCATCATGGCCATAAGTCTGGACTTCAGGCATGCTACATGTCCGAT
ACAGGTCGATCGTGACGTGGAACCTATCCCAAGCCGTCATCATTGCAATGCAGA

Cepa My0127

Secuencia:

GCAGTCGAACGATGAAGCCAGCTTGCTGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTA
ACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGAGCGCCACCGCATGGTGGGTGTTGGAAAGATTTA
TCGGTTTTGGATGGACTCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGAAGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCC
TGAGAGGGTGACCGGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCAC
AATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGTAGGGAAG
AAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACACTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAG
GCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTGTGCTGAAAGTCCGGGGCTTAACCC
CGGATCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCA
GATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCTGTAACACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGC
GAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGACCATTCCACGGTTTCCGCG
CCGCAGCTAACGCATTAAGTCCCCGCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
GCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTTCTCGATCGCC
GTAGAGATACGGTTTCCCTTTGGGGCGGGTTCACAGTGGTGCATGGTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCGCACGAGCGCAACCCTCGTTCCATGTGCAGCACGTGATGGTGGGACCTCATGGGAGACTGCCGGTCACT
CGAGGAAGGTGAGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTGGGCTCACGCATGCCTACATTGACCGGTACATTGGG
ATGCCAATCTGTGAGGTGGAACTTATCCGAAAAGCGTCTGAGATTCTCGAATGGAGGGGTTCTTGCTACT

Cepa My0128

Secuencia:

TCTTTACTTCCAAGCGGACCTTGGGGGTTTTGGCTCATGGGAGAGAAACGCGGGGAATTTACCTTGTGGTAGGGAATC
CCATTGGGAACGACGGCACATACCCTATGAGCCCTATGGGGAAAAGATTTATCGCCATGAAATGGGCCACGTTAAATA
TCCTGGTTGGTAAGGAAATGGGTTACCAAGGCGACGAACTTTAGCTTGTCTGACAGGAAAAGAAAGCCGGGGGAAACGG
GAGGGAAGGTGAGAGGGGACGGGAGACTCATAGGAAATATTGAAGGGTGGGGGCAACCCTGAACAGTCCATGCCGC
GTGAGTGATGACGGCCTTATTGTTCCGGACTCTCTCAGACTGTGGATTATGTCATTAAGTCAAAGGTGCCCTTCTATC
TTCGTGCCTGCAGCCGAGTAATACCAAGGGGGCTAGCCTTGTTCGGAATCACTGGGCGTAAAACGTACGCTCGCGGA
CTGATGAGTCAGGAGGAAATCACGGGGTTCGGCCCTACTGGTGCCAATGATACTGGCAGTCTTGATATCAAAAGAGG
TGAGTGGAACTCCGACCGTAAAGATGGAAGTCTGATATTCGGAATAACGGCAGTAGAAGAAAGATAGCTCACAGTTC
TACTTACTGACGCTGAGGTACAAAAGCGTGGCAAGCAAACAGGATGTACATACCCTTGTCTACCCACAGTAATCGA
TGAAAGCTGGAAGGACTGGTAGCTCGTTAGTTAGTGACACACCTCACGCTTTCAGCGCTCCCGCCGGGGAGTAGTGG
TCGCAAGAGTTCCTACTCAGAGGAATTTGCCTGCGGCCCTCACACACACTGCACCCTGTTGGCTTCACTTCAAAGCAGC
ACTCAAAACATTACCATCCCTTGCCATTTGACGACTACAACCGAGACTGATTTGTTTCATGACCTGGATATCAAGACCAAG
TGCTCCAAGTGCCTCCCGCGTATTAGGATTTGCGGC

Cepa My0129

Secuencia:

ATGCAGTCGAACGATGAAGCCCAGCTTGTGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCT
TAACTCTGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACCGGATAGGAGCGCCTACCGCATGGTGGGTGTTGGAAAGATT
TATCGGTTTTGGATGGACTCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAGGCGACGACGGGTAGCCGG
CCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGC
ACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGTAGGGA
AGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGC
GAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTGTGCTGAAAGTCCGGGGCTAAC
CCCGATCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCG
CAGATATCAGGAGGAACCCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGA
GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGACCATTCCACGGTTTCCG
CGCCGACGCTAACGCATTAAGTGCCCGCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGC
CCGCACAAGCGGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGACATGTTCTCGATCG
CCGTAGAGATACGGTTTTCCCTTTGGGGCGGGTTCACAGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGAAATGTT
GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCCATGTTGACGACGTCATGGTGGGGACTCATGGGAGAAGTGGCG
TCACTCGGAGGAAGTGAGACGACGTCAAATCATATGCCCTTATGTCTGGGCTTACGCATGCCTACATTGACGGTAC
AATTGGTATGCTAATCTGTCAAGGTGGAACCTAATCGAAAGGCTGTCTTAGATTGGAATTGGGGTTCTGTCT

Cepa My0130

Secuencia:

ACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGTCCCTGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCT
GCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATTATAAAA
GGTGGCTTTTGCCTACCCTTTCCGAAGGGCCCCCGGCCATTACCTATTGGTTGAGGTACCGCTCCCCAGGGCACC
AATCCTTACCCACCTTAGAAGGGGAACCGCCCCCGGGAAGTGAACCCCGGCCAAAACCCACCGGAAGGCACCATT
AGGAAACCTCCCGCATGGAACAAAGTCCGAACGAACACCCCCCTGGATGGATAAAGGTTTCCGAATCTTAAACCCCG
GTGGTTAGGAAAACCAATTCCCTTTCAATTAGGGCGGACCCTTGCCGGACCTTACCAGAAAAGCCAGGTTAATTACT
GGCCACCACCGCCGGTATTCTTAGGTGGCACCGTGGTCTGGGATTTATGGGGCGTAAGCCGCGCCAGCCGTTTCTAAT
CTGATGTGAAAGCCCCGGTTAACGGGGAGGGTCAATTGAAACTGGGGAAGTGGATTGCGAGAGAGAGTGGATTCCACG
TGTAGCGTGAATGCGTAGAGATGTGAAGAACACAGTGCCGAGCGACTCTGTCTGTACTGACGCTGAGCCGAAGCTG
GGAACGACGATAGATACCTGTAGTCAGCGTACGATGATGCTACGTCGAGTCGCATAGTGTGCTGACGACCATAGACTCG
CTGATACGTCGTAAGTACCAGATGACGGTCCGAGCGTACATTGATATCGAGCACGCGACTACCGCTGACTCTGACACT
AGATGCTCTCGGCATGAGTGTGATGTTGGTAGCTAGTCTGAGTGTAGTCTGAGACTATGACATGCAGACATGACTAGTAC
TCGTCA

Cepa My0131

Secuencia:

ATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC
CTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATTATAA
AAGGTGGCTTTTGCCTCCCTTTTCAAAGGGCCCCCGGCCCTTACTTATTGGGGGAGGAACCGGTCCCCAGGGCA
CCAATGCTTACCCAACCGGAAAGGGGGACCGGCCCTGGGAATGGAACCCGGCCAAACCCCTCCGGAAGGCACC
ATAAGGGAATCTCCGCATGGAACAAAATCCGAACGAACCACCCCCCTGGATGAATAAAGGTTTCCGAATCTAAACTT
TGGTGGTAAGGAAAAACCAATTCCCGTTCAATTAGGGCGGACCCCTGCCGGACCTTAACCGAAAGCCACCGTTACTTC
CTGGCCACCGCCGCGTAATTACTAAGTTGGCAGCCTTGTGAGAATAATGGGCGTAAGCCGCGCCAGCCGTTTCTAAG
TCTGATGTGAAGCCCCGCTCACCAGGAGTCAATTGGAACCTGGGGAACCTTGAAGTGCAGAGAGGAAGTGAATTCCACG
TGAGCGGTGAATGCGTAGAGATTGAAGACGCAATTGCCAAGCAACTCCTGTCTGACTTGAAGCTGAGCCGAAGCTT
GGAGCGACCGATAGATACCTGTAGTCAGCTGTACGATGAGCTACGTGATGCTCGCATATGCTGCAGCAGCATAGCTACT
AGATACGTCAGACTGACTCAGATGACTGATCGTATCGTGACTGGTATCGAGCATCGAGACTACAGTCTGACCTGCACTG
ATGCTCTCGCAGTCGTGTCAGTGGCACTGTCTGACTGC

Cepa My0132

Secuencia:

ATGCAAGTCGAGCGGAAAGAGTGGGAAGCTTGCTCCATTCTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACC
TGCCCTACAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGGTAATACATAGCATCGCATGATGCAACGTTGAA
AGTTGGCCTTCGGCTTACCCTGGAAGGTGGGGCCCCGCGCCATTACTTATTTGGAAGGAAACGCTTACCAAAGGCC
CCATGCCTAACCGAACCGAGAAGGGGTCCGCCACTGGGGCTGGAACACCGGCCAAAATCCTACCGGAGGGAGCA
GTAAGGAATCTTCGCCATGGAACAAAGTCTGACCGAACACCCCCCTGAATGACCAAAGGCTTCCGTCCTAAAGCT
TTTTTGTAGGGAAAAACAGTTCCGTTCCGATTGGGGGGGACCTTGACCGACCTAACCCGAAAGCCCCCGTTAATT
CCTGCCCGGCGCCGCGTAATTCCGAGGGTGGCAGCCTTTGCCCGGATTATGGGCGTAAAGCGCGCAAGGGGTCTC
TTAAGCTGATGTGAAAGCCAGGCTCAACCGTGAAGGCCATTGAAACTGGGGACTTGAAGTGCAGAGAGGAGAGTGG
AATCCACGTGTGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGAGGAACACCAGTGCGAAGCCGCTCTCTGGTCTGTAACGACCTA
AGCCGAAGCTGGAACGACCGATTAGTTCCTTGTAGTCAAGCGTAACGATGATGACGCTAGTGTGGGTGATCTATGCTGA
GTACATAGCACTCGCTGCGTACGACGAGTGACCAGATGACGGTCGCAGCATGACTGTATCGAGCACGCGACTACAGCT
GGCTCTTGCTAGATGACGCTAGCAGTACTGTCATGTGTCGTAGCTTGTCTGATGTGTAGTAGCAGAGCACTGATCTA
GTGCAGCATAGTGACCTAGTACTCGTCAACGGAGATGTAACCTATCTC

Cepa My0133

Secuencia:

ATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTG
CCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGTTTGATTGAACCGCATGGTTCAATTATAAAG
GTGGCTTTTAGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACG
ATGCGTAGCCAACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGTGAAGTTTTGGATCGTAAAACCTC
TGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGTACCTTGACGGTACCTAACCGAAAGCCAGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGTTT
CTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCAATTGAAACTGGGGAACCTTGAAGTGCAGAAGAGGAG
AGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGT
AACTGACGCTGAGCGCGAAAGCGTGGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCCCGCCGTAACGATGAGT
GCTAAGTGTAGAGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAGCCACTCCCGCCTGGGGAAGTACGGTCCG
AGACTGAACTCAAAGGATTGACGGGGGGCCGCCACAGCGGGTGGAGCATGGTGTTTTATCCGAGCACGCGAGACCT
TACCAGTCTGACATCCTCTGACACCCTAGAGATAGGGCTTCCCCTCGGGGACAGTGAAGTGGTGCATGATGTCGTTCC
AGCCTCGGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCACGAGCCCACCTTGATCTAGTGCAGCATCAGTGCACCTCTAGGTA
CGGTACGGAAGTGATACTCATCTCATGCCTTGACTGGCTCAACGTACCATGCACACGACGAATCCAGCTAGACTCCAC
TGTTCAATTCGTGC

Cepa My0134

Secuencia:

ATGCAGTCGACGGGAGAAATGGGAGCTTGCTCCATTTCTACGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGC
CCTACAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGTAATACATAGCATCGCATGATGCAACGTTGAAAGT
TGGCCTTTGGCTAACACTGTAGGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTAAGGGAACGGCTTACCAAGGGCAGCA
TGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
GGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAACAACGCCCGTGAGTGACGAAAGGCTTCGGGTGCTAAAGCTCT
GTTGTTAGGGAAGAAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACC
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTC
TTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGAAGGCCATTGGAAGTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAAGAGA
GTGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAAGCGGCTCTCCTGTCTGTA
ACTGGACGCTGAAGCGCGAAAGCCGTGGGAGCGAACAGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTG
CTAGTGTGGGGGTTCCACCCTCAGTGCTGAAGTTAACACATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCAGCAAGTT
GAAACTCAAAGAATTGACGGGGCCGCACAAGCAGTGAGCATGTGTTTAAATTCGAAGCAGCGAAGAAGTACAGTCTTG
ACATCTGCACTCTAGAAGAAAGACGTCTCCGGGACAGATGACAGTGTGCATGTGTCGTCAGCTCAGTCTGAAATG
TTGTAGTCCGCACGAGGCACTGAATCTAGTGCAGCATAGTTGAATCTAGTACTGCGGTACAACAGAGCAGTGGACACG
TCATCCTATGCCTCAGACTGGCTACACTGTCTCATTGACGTTCAATGGCA

Cepa My0135

Secuencia:

TGCAGTCGAACGGATCCTTCGGGATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAACCGGTGGGAAGCTACCTTGTGGTAGGGAAACAA
CAGTTGGAAACGACTGCTAATACCCTATGAGCCCTATGGGGGAAAGATTTATCGCCATGAGATGTGCCCCGCTTAGATT
AGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCGACGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACT
GAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGC
CGCGTGTGTGATGACGGCCTTAGGGTTGTAAGCACTTTCAGCAGTGAAGATAATGACATTAAGTGCAGAAGAAGCCCC
GGCTAACCTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGTACGT
AGGCGGATTGATAAGTTAGGGGTGAAATCCCGGGCTTAACCCCGGAACTGCCTTTGATACTGTCAGTCTTGAGTTTCA
GAGAGGTGAGTGGAACTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACACACAGTGGCGAAGGCGGCTCA
CTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
CGATGAATGCTAGTTGTCAGGGTGCCTTGCACCTTGGTGACGCGACTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGT
CGCAAGATTAAGAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGCA
GAACCTTACCAGCCCTTGACATTTGGCGCTACAAGTGGAGACGCTTGGTTCCCTTCGGGGACGTCAGGACAGTGTCTG
ATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGAATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTGCCAGC
ATTTAGTTGGGCACTTTCAGGGACTGCCGGTGATAAGTTCGAGAAAGGTTGGGGATGACGTCAAGTTCCCTCATGCCCT
ACGGCTGGCTACACAGTGTACATGGCGGGTACAATGGGCACGACCCCGCGAGGGGGAGCTTATCTCTCAAGGCC
GTCCAGTTCGGAATGTTCCCTGGCAACTCGAGACAGAGATTTGGAATCCGCATGTATAATCTCGCTTAACAGCCT

Cepa My0136

Secuencia:

AGTCGACGGATCCTTCGGGATTGTGGGTGAGGGGTGATGAACGCCTGGGAAGCTACCTTGGGGTAAGGAACCCCTTGTT
GCTGACGACTGCTCATACCCTATGAGCCCTATGGGGGAAAGATTTATCGCCATGAGATGTGCCCCGCTTAGATTAGCTT
GTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAGGCGACTATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACA
CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCACTGATGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTG
TGTGATGACGGCCTTGCAGTTGTAAGCACTTTCAGATGAGAAGATAATGACTTTAACTGCATAAGAAGCCCGGCTAA
CTTCGTGCCCGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGTACGTAGGCG
GACTGATCAATTATGGGTGAAATCCCGGGGCTCAGCCCCGGAAGTGCCTTTGATACTGTCAGTCTTGATTTCCACAGAG
GTGAGTGGAACTCCGAGTGTACAGGTGAGATTGCTAGATATTCGGAATAACACCAGTGGCGAAGGCAGCTCACTGGCT
CGATACTGACGCTGATGTACAAAAGCGTGCAGGACACACATGATGACATACCCTGGTAGTCCACTCCGTAGACGATGA
GTGCTAGTTGTCAGGTAGCTCGCTCTTTGGTACTCAGCTCACGCAGTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTCCCGTTCGCAA
GATTAAGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCGCACAGCAGGGGAACATGTGGTTTAAATTCACAGCAGCGCGCACAACC
TTACCAGCCCTTGACATTTGGCGCTACAACGGGAGACAGCTGGTTCCCTTCTGGGACGTCACGGACACGTGCTGCATG
GGCTGTGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGCTTGGGTTAAGATCGCGTCAACGAGCGCTACTCGTCTCCTTAGTTGCATG
ATTCGTCGGCACTCTAGGCGTACTGCCGGTATCAGCCGAGAAAGGTGGGGATGACGTCAATCTCATGGCCCTTACT
GCTGACTTAGCACATGCTACAATGCTGTGACTGGCAGCGTACTCCTCAAGGTAGCCTAATCTGCAGAGACATTTCGAT
CGAATGCTCTGCACTGAAGACATGAAGCTGGAAATCGCTAGTAATTCGCGGATAACAGC

Cepa My0137

Secuencia:

ATGCAGTTCGAACGGATCCTTTCCGGATTAGTGGGCAGACGGGTGAGTAACCGCTGGGAAGCTACCTTGTGGTAGGGA
ACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCCTATGAGCCCTATGGGGGAAAGATTTATCGCCATGAGATGTGCCCGCGTTA
GATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCGACGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGG
ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCA
TGCCGCGTGAGTGATGACGGCCTTAGGGTTGTAAGCTCTTTCAGCAGTGAAGATAATGACATTAAGTGCAGAAGAAGC
CCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGGAATCACTGGGCGTAAAGCGTA
CGTAGGCGGACTGATCAGTCAGGGGTGAAATCCCAGGGGCTCAACCCCGGAAGTGCCTTTGATACTGTCAGTCTTGAGA
TCGAGAGAGGTGAGTGGAACCTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGC
TCACTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGGTAGTCCACGCCG
TAAACGATGAATGCTAGTTTGTAGGTAGCTTGTATTTTGGTGACGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAG
TACGGTCGCAAGATTAATAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCAAGCA
ACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATTTGGCGCTACAACCGGAGAACGGTTGGTTCCCTTCGGGGACGTCAGGAC
AGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAGGAGCGCAACCCTCGCCCTA
GTGCAGCATTAGTGGGCACTCTAGGGGACTGCCGTGATAGCCGAGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGCCCT
ACGCTGGCTACCCACGTGCTACAATTGGCGGTGACAGTTGGCAGCGACCTTCGCGAGGGAGCCTATTCTCAAGCCGTC
TCTCACTTCGGAATGTCTCGCACTCGAGCATGATGGAATCGCATGTATGCCGTAACAACATGACCGGTAACCTCGA