



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

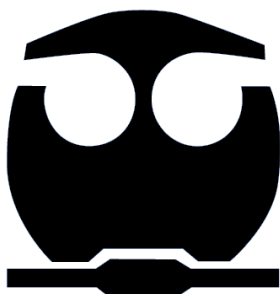
CARACTERIZACIÓN POLIFÁSICA DE UNA CEPA DE *Streptomyces* AISLADA DE UNA REGIÓN DEL VALLE DE CHALCO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

MARIANA AVALOS GARCÍA



MÉXICO, D. F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente Profesor: **RAÚL GARZA VELASCO**

Vocal Profesor: **RUTH EDITH MARTÍN FUENTES**

Secretario Profesor: **SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL**

1er sup. Profesor: **ALEJANDRO CAMACHO CRUZ**

2do sup Profesor: **MARÍA DEL CARMEN URZÚA HERNÁNDEZ**

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio de Microbiología Industrial, Departamento de Biotecnología y Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Dr. Sergio Sánchez Esquivel

Asesor

E. en B. Marco Antonio Ortiz Jiménez

Supervisor Técnico

Mariana Avalos García

Sustentante

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de pertenecer a la máxima casa de estudios de México y brindarme una excelente formación tanto personal como académica.

A la Facultad de Química por albergarme todos estos años y por la enseñanza que me permitirá desarrollarme como profesionista.

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel, no solo por ser mi asesor dentro de este proyecto, sino por su calidad humana, por confiar en mí y por el tiempo dedicado.

A la M. en B. Beatriz Ruiz Villafán, por la asesoría para la realización de este trabajo, por la paciencia mostrada, por todos los conocimientos compartidos y en especial por siempre tener tiempo para compartir y escucharme.

Al E. en B. Marco Antonio Ortiz Jiménez por la asesoría recibida para la elaboración del proyecto, por el apoyo, material y el tiempo brindado.

A la Maestra Yolanda Hornelas por la asistencia en la observación de las muestras al microscopio electrónico.

A los profesores Raúl Garza Velasco y Ruth Martín Fuentes, por aceptar ser mis sinodales, por las observaciones realizadas y por el tiempo invertido en la revisión de este trabajo.

DEDICATORIAS

Esta tesis está dedicada a todas aquellas personas que son o han sido parte importante de mi vida, que han compartido momentos conmigo, que me han brindado su tiempo y han dejado huella en mi vida.

A mi mamá, por apoyarme siempre, por escucharme y estar a mi lado brindándome cariño, palabras de aliento y de consuelo. Gracias mami por hacerme la persona que soy ahora, por guiarme durante toda mi vida, por dejarme volar y cumplir mis sueños. Esto es un logro de las dos. Te amo mami.

A mis abuelitos Chabelita y papi Modesto, Gracias por cuidarme y educarme, sé que siempre están conmigo.

A mi tía Vicky, gracias por todo el apoyo y cuidado que siempre me has dado, gracias por ser mi segunda mamá.

A mis tíos: Tino, Dochis y Zita por los momentos especiales compartidos y por el respaldo brindado.

A Tanis y Chris, gracias por ser mis hermanitas mayores, por cuidarme siempre y por las alegrías vividas, las quiero mucho.

A todos mis primos porque siempre han estado a mi lado y por la enseñanza que me han dejado.

A mis amigos de toda la vida: Omar, Laura L, Laura V, Livier, Monse, Luisma, Clau, Lynda, Memo y Mario, gracias por ser mis amigos desde hace casi 20 años.

A mis amigos de la Facultad:

A Goretti por esa amistad desde el CCH, por las confidencias compartidas, gracias por ser una persona tan linda conmigo, espero que nuestra amistad sea para siempre.

A Bea y a Meche, por ser mis amigas, por toda una carrera y un sinnúmero de horas de clase y laboratorio, por esas risas y trabajos a las carreras, las quiero y espero que sigamos siendo amigas.

A Zaine y María, gracias por estos últimos años en los que se convirtieron en mis grandes amigas.

A Oscar y Ricardo, por todas las risas, las fiestas y los momentos especiales.

Vera, eres una chica única, me alegra haberte conocido y ser tu amiga.

A Sarita y a Pau, gracias por todos esos momentos tan divertidos, por seguirme la corriente y no abandonarme.

A Roberto, por ser un chico singular, por entenderme sin palabras, por apoyarme y escucharme siempre.

Raquelito, gracias por las clases de salsa. Te quiero mucho y espero siempre tenerte como amiga.

A los QA's por los momentos tan divertidos: Ania, Dennis, Alexis, Itzia, Maty, Ireri.

A Jorge, gracias por ser mi apoyo durante la carrera, por el cariño incondicional brindado, gracias por los momentos compartidos, siempre los atesoraré, sé que son pocas las palabras para decirte que te quiero mucho.

A una persona muy especial que me ha acompañado durante toda la carrera, gracias David por ser mi compañero, mi mejor amigo, mi hermano, mi confidente, mi todo. Sé que pase lo que pase, siempre estaremos juntos y siempre estarás en mi corazón. Gracias por quererme tanto. Te amo.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio: Brenda, Diana, Cecy, Mauricio, Yolis, Silvia, Alex, Adán, Hugo, Angela, Lalo, Tania, Alba, Anita y Teresita. Gracias por ser como una familia para mí, por todas esas horas juntos, las risas y los momentos de estrés. Aquí no aplica la familia pequeña vive mejor.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	3
I. Marco teórico.....	6
II. Diseño experimental.....	30
III. Resultados y discusión.....	55
IV. Conclusiones.....	90
Bibliografía.....	92
Anexos.....	99

RESUMEN

La caracterización polifásica es actualmente una de las metodologías más empleadas para clasificar a los microorganismos debido a que utilizan distintos estudios que aportan una variedad de resultados con los que se realiza una identificación más apropiada y confiable. Entre los diversos enfoques que incluye, se encuentran el morfológico, fisiológico, bioquímico, quimiotaxonómico y genético, que en conjunto nos permiten identificar al microorganismo en estudio.

Streptomyces es el género predominante de las actinobacterias. Actualmente se conocen más de 500 especies de *Streptomyces*, de las cuales, la mayoría se ha aislado de suelo. Este género posee una gran importancia biotecnológica por su capacidad de producción de metabolitos secundarios de interés industrial. En el laboratorio recientemente se aisló una cepa a partir de tierra de jardín, que fue denominada K-155. La caracterización preliminar de la misma por su secuencia de DNA ribosomal 16S, estableció su pertenencia al género *Streptomyces*, pero no se determinó su especie. Por lo tanto, este trabajo se enfocó a establecer la especie a la que pertenece la cepa de *Streptomyces* K-155.

Los experimentos realizados fueron: la micro y macromorfología, las condiciones de crecimiento a diferentes condiciones de cultivo, tales como pH y temperatura, así como el uso de diferentes fuentes de carbono, el análisis de la

pared celular, la producción de algún metabolito secundario con actividad antibiótica y la determinación de la secuencia completa del DNA ribosomal 16S.

Para hacer una comparación con cepas de referencia se emplearon *Streptomyces aureus* y *Streptomyces thermocarboxydus*, las cuales poseen cierto parecido a la cepa K-155, en cuanto a la secuencia parcial de DNA ribosomal 16S. De esta comparación con las cepas de referencia se observaron diferencias importantes en cuanto a su morfología y fisiología, con lo cual se descartó la pertenencia de K-155 a alguna especie conocida. Por lo tanto se propone como una nueva especie.

INTRODUCCIÓN

El conocimiento de nuevas especies de microorganismos siempre ha despertado interés. En la actualidad el número de especies que han sido identificadas es muy bajo, aproximadamente del 1%, por lo que aún falta mucho por conocer acerca de la microbiota que habita los diferentes ecosistemas como el suelo, los mares, ambientes extremos etc.

El descubrimiento de algunos nuevos microorganismos ha llamado la atención debido a su capacidad para producir metabolitos secundarios que pueden tener actividad antibiótica, antiparasitaria, hipocolesterolémica, anticancerígena entre otras [12].

La identificación de los microorganismos productores de estas sustancias resulta importante para conocer el tipo de metabolito secundario que está produciendo.

En general una identificación confiable de bacterias implica todo un conjunto de análisis; por ejemplo, el estudio de sus características fenotípicas, fisiológicas, bioquímicas y genéticas entre otras. El análisis de todas estas propiedades en conjunto, se conoce como caracterización polifásica.

Con esta serie de características, es posible realizar una clasificación de las bacterias, ya que el conocimiento y la descripción de las mismas permite arreglarlas en grupos con base en sus similitudes y relaciones filogenéticas.

En el presente trabajo se describen las actividades y pruebas realizadas para efectuar la caracterización de una bacteria perteneciente al género *Streptomyces*, que fue aislada del suelo de un jardín. Dicho género es el más extenso dentro de las actinobacterias y se le encuentra abundantemente en el suelo. Posee importancia biotecnológica, debido a su producción de metabolitos secundarios de diversa naturaleza, sin embargo, se le concede una especial relevancia a la síntesis de antibióticos, ya que 80% de estos compuestos producidos por microorganismos llegan a ser generados por *Streptomyces* [17].

Objetivo general

Determinar a qué especie del género *Streptomyces* corresponde la cepa K-155

Objetivos particulares

1. Realizar un análisis morfofisiológico, bioquímico, quimiotaxonómico y genético de la cepa K-155 de *Streptomyces*.
2. Determinar cualitativamente si K-155 posee algún tipo de actividad enzimática de interés.
3. Determinar si K-155 posee actividad antimicrobiana.
4. Realizar un estudio comparativo de este microorganismo con las especies *Streptomyces thermocarboxydus* y *Streptomyces aureus*.

Hipótesis

Con base en la caracterización previa realizada en el laboratorio, en la cual se determinó la pertenencia de K-155 al género *Streptomyces* pero no su especie, se propone que esta cepa corresponde a una nueva especie.

I. MARCO TEÓRICO

La microbiota del suelo

El suelo contiene una amplia diversidad de microorganismos tales como bacterias, hongos, protozoarios, virus, etc., los cuales participan en diversos procesos biogeoquímicos; la microbiota es la responsable de mantener la fertilidad del suelo degradando la materia orgánica presente en él, así como de proveer de algunos nutrientes necesarios para las plantas [51].

Entre las bacterias que forman parte de la microbiota del suelo destacan los actinomicetos; varias especies de las cuales han adquirido gran importancia debido a que son capaces de producir metabolitos con diversas actividades. Un ejemplo, son los antibióticos, que han despertado un interés biotecnológico e industrial, promoviendo un mayor estudio de estos microbios en la actualidad.

Se ha sugerido que los estreptomicetos están involucrados en la descomposición de los componentes del suelo debido a su capacidad de producción de enzimas hidrolíticas, sin embargo, estos estudios han sido realizados en laboratorio, por lo que realmente de su actividad en el suelo se conoce poco.

Cuando se desea estudiar a este tipo de microorganismos generalmente se toma una muestra de suelo de la cual se aíslan los microorganismos presentes.

A pesar de que en la actualidad existen nuevas técnicas de biología molecular como la metagenómica, se siguen empleando técnicas básicas de aislamiento de microorganismos, sobre todo cuando se desea trabajar con un tipo o especie en particular, por lo cual se desea separar del resto de los microorganismos presentes en una muestra de suelo.

Aislamiento y conservación de una cepa

Para determinar las características de una especie en particular, es necesario contar con un cultivo puro, lo que implica que se trabajará con el microorganismo aislado, libre de otros microorganismos contaminantes. La cepa se puede aislar por diversos métodos y posteriormente debe ser conservada para garantizar que se mantiene en condiciones determinadas y controladas para evitar cambios y realizar los estudios lo más uniformemente posible.

Técnicas de aislamiento

a) Aislamiento por estría en placa

Esta técnica es de las más sencillas, ya que únicamente se requiere del medio sólido adecuado en placa. Se toma una muestra con el asa bacteriológica y se

siembra en la placa en forma de estrías, por secciones o cuadrantes (fig. 1.1.) para agotar la muestra y obtener colonias aisladas.

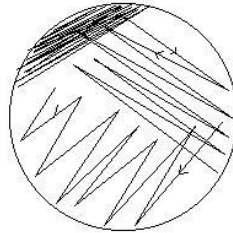


Figura 1.1. Técnica sugerida a seguir en el método de aislamiento por estría.

b) Diluciones seriadas

Para aislar microorganismos de muestras de suelo, existen diversas técnicas efectivas, una de las cuales consiste en realizar diluciones, para tratar de obtener la menor cantidad de células y así plaquearlas en cajas Petri con medio de cultivo para obtener colonias aisladas. Esta técnica se apoya también en el uso de medios de cultivo selectivos y/o diferenciales, los cuales permiten el aislamiento y selección cuando se tiene interés en un tipo específico de microorganismo.

Métodos de Conservación

Existen varios métodos para preservar los microorganismos, y la elección de alguno en particular depende del tiempo que se desean almacenar, así como del tipo de microorganismo; por ejemplo, los de conservación a largo plazo

incluyen a la congelación y la liofilización, los cuales, detienen el crecimiento de los microorganismos evitando cambios en el material genético e impiden su contaminación [13].

a) Congelación

La conservación por congelación se realiza colocando a las células en suspensión, con un agente crioprotector como el glicerol y aplicando temperaturas inferiores a 0°C. Los siguientes factores influyen en la estabilidad o viabilidad de las células conservadas de esta manera [13]:

- Edad de las células. Se prefiere conservar células que se encuentren al inicio de la fase estacionaria.
- Velocidad de congelación. Las variaciones de temperatura se deben realizar en el menor tiempo posible
- Temperatura de almacenamiento. Entre más baja sea la temperatura es mejor, ya que se disminuye el metabolismo de los microorganismos; de esta manera no existe crecimiento de los mismos y se reduce la probabilidad de contaminación.
- Uso de agentes crioprotectores. Estos reducen la cantidad de hielo formado evitando daño a las células.

b) Liofilización

La conservación por liofilización se lleva a cabo realizando en primer lugar una congelación de las células, para después eliminar el agua por sublimación, por lo tanto se deben tomar en cuenta los mismos factores que en la congelación. Sin embargo, los crioprotectores empleados son diferentes dependiendo el microorganismo. En el caso de los actinomicetos se recomienda el uso de leche descremada [13]. Los factores que influyen en el proceso de liofilización son:

- El tipo de microorganismo. Algunos no resisten el proceso debido a la cantidad de agua que contienen.
- La concentración de células. Se deben emplear concentraciones altas (10^8 , 10^9 cel/mL).
- Temperatura de sublimación. No mayor a 50°C
- Cantidad de oxígeno dentro del tubo. Las células se conservan en tubos cerrados al vacío para evitar que el oxígeno dañe las células o que permita la rehidratación.
- Almacenamiento. La temperatura debe ser constante y de aproximadamente 20°C , sin bajar de los 0°C y en oscuridad.

Con estos métodos las células se mantienen viables por meses o años, lo que resulta particularmente benéfico cuando se va a trabajar con el microorganismo

durante un periodo prolongado, o simplemente cuando se desea conservar en una colección.

Clasificación de microorganismos

La clasificación corresponde a la organización de los microorganismos y puede realizarse de diferentes maneras, si bien “Una buena clasificación es aquella que satisface” (Mandel,1969), es necesario realizar estudios que demuestren diferencias o similitudes que permitan realizar la agrupación.

Para realizar la clasificación adecuada de una bacteria se requiere conocer diversas características de su morfología, su bioquímica, fisiología y genética. Este proceso puede llevarse a cabo para organismos ya descritos o nuevos, aunque, cuando el microorganismo es nuevo, es decir, no ha sido previamente identificado y, por tanto, no concuerda con las características de ningún taxón, puede ser nombrado y colocado en la posición correspondiente dentro de la clasificación existente (por ejemplo una nueva especie en un género ya existente) [6].

Taxonomía bacteriana

La taxonomía bacteriana posee dos enfoques: el clásico, que se ha venido usando desde hace mucho tiempo y el enfoque genético o molecular. Consiste también de tres rubros conectados entre sí: la clasificación, la nomenclatura y la identificación. La clasificación es el arreglo de los organismos en grupos (taxa) con base en sus similitudes. La nomenclatura es la asignación de nombres a los grupos taxonómicos, de acuerdo a reglas internacionales (International Code of Nomenclature of Bacteria e International Committee on Systematics of Prokaryotes) [55]. La identificación es el uso práctico de un esquema de clasificación para determinar la identidad de un organismo aislado como miembro de un taxón establecido, o como miembro de alguna especie no identificada previamente [6].

La taxonomía posee una unidad básica, a la cual se le llama cepa, esta corresponde a una población de células genéticamente idénticas que derivan de la división sucesiva de una sola célula. Al grupo de células con características en común se le denomina especie. La especie se considera como el grupo taxonómico más importante dentro de la sistemática bacteriana. Todas las especies bacterianas son asignadas a un género, que está definido como una o más especies con las mismas características fenotípicas y que además se encuentran agrupadas con base en la secuencia de su rRNA 16S.

Los primeros intentos realizados para clasificar a las bacterias, se basaban en criterios puramente morfológicos. Sin embargo, con la introducción de cultivos puros y con la detección de nuevas especies que presentaban las mismas características morfológicas entre sí, se hizo necesario comparar las diversas características de las cepas aisladas.

Por ello, para evitar clasificar a una especie como un nuevo microorganismo, actualmente se emplea un enfoque polifásico.

Caracterización polifásica

La caracterización polifásica es una nueva tendencia empleada en la identificación de los microorganismos, la cual involucra distintos tipos de caracteres: fenotípicos (morfológicos, fisiológicos, quimiotaxonómicos y bioquímicos), genéticos (hibridación DNA-DNA, %G-C) y filogenéticos basados en el DNA que codifica para el RNA ribosomal 16S. Este tipo de caracterización parece ser el mejor acercamiento para contar con una descripción más certera pero, sobre todo, más válida de las diversas especies [6].

Análisis morfológico. La observación de la morfología de una bacteria es el inicio de un análisis polifásico y corresponde a una de las características con mayor importancia pues, en general, las integrantes de un género presentan la misma forma y estructura. Además, es un rasgo que suele mantenerse a pesar de los cambios a los que pueda estar expuesta la célula, por lo que resulta muy

confiable. La macromorfología se refiere al tamaño de la colonia, el color, la forma o a si produce o no micelio, mientras que la micromorfología establece si se trata de bacterias Gram-positivas o Gram-negativas, el tipo de células de las que se trata, si son o no capsulados o esporulados, etc.

En el caso de los estreptomicetos, la morfología juega un papel muy importante para la identificación del género y, a su vez, para la determinación de las especies, gracias a que, en su ciclo de vida, las células sufren una serie de transformaciones que permiten su caracterización.

La morfología colonial del género *Streptomyces* no es muy utilizada como criterio taxonómico, a diferencia de la producción de pigmentos y el color de las esporas. En un principio, al género *Streptomyces* se le asignaron siete series de colores: azul, gris, verde, rojo, violeta, amarillo y blanco; sin embargo, ello presentó algunos problemas, debido a que se determinó que el color se ve influenciado por factores como la composición del medio, el tiempo del cultivo, la temperatura y el pH, entre otros. Por otra parte, la mayoría de las especies del género *Streptomyces* caen dentro del rango de color gris, por lo que actualmente este es un criterio taxonómico importante, solo cuando los pigmentos producidos sean notables como el azul, verde oscuro, rojo o violeta [5].

Análisis fisiológico. Las pruebas fisiológicas resultan de gran importancia ya que de ellas se obtiene información como por ejemplo, las condiciones óptimas de cultivo de un microorganismo, incluida la temperatura, el pH, el carácter

aerobio o anaerobio del microorganismo. De igual manera, todos estos parámetros pueden variar de una especie a otra, dependiendo el medio ambiente en el cual se haya encontrado la cepa.

El género *Streptomyces* es conocido como un quimioorganoheterótrofo, generalmente desarrolla un buen crecimiento en medios de cultivo ricos. Sus integrantes son capaces de emplear fuentes de carbono simples como la glucosa, manitol, glicerol, manosa y complejas como la celulosa, el almidón y la caseína [5].

Para la producción de esporas se emplean medios con una alta proporción de carbono-nitrógeno como los recomendados en el International *Streptomyces* Project (ISP) [33]:

ISP-1: Extracto de Triptona - Levadura

ISP-2: Extracto de malta, Extracto de levadura y Glucosa

ISP-3: Avena

ISP-4: Almidón – Sales Inorgánicas

ISP-5: Agar Glicerol - Asparagina

Los estreptomicetos, como las bacterias en general, crecen de manera adecuada a valores de pH cercanos a la neutralidad (6-8) [5].

Así como ciertas levaduras y bacterias pueden crecer en ambientes con concentraciones de hasta 30% de NaCl, también existen especies de

Streptomyces aisladas principalmente de suelos salitrosos que suelen crecer en concentraciones de NaCl de hasta 7%. Esta característica puede ser empleada dentro de un enfoque polifásico, ya que las concentraciones toleradas por diferentes especies de *Streptomyces* pueden variar y contribuir a su clasificación [41].

La mayoría de las especies de *Streptomyces* son mesófilas, si bien se trata de microorganismos que habitan en una gran diversidad de ecosistemas; de hecho pueden encontrarse especies termófilas e incluso extremófilas en lugares con temperaturas extremas, tales como geiseres y las zonas polares. Por ello, esta característica es importante, tanto para determinar condiciones óptimas de crecimiento de dicha bacteria, como para identificar su especie.

Análisis bioquímico. Las pruebas bioquímicas son de diversos tipos. Existen, por ejemplo, los kits comerciales que permiten evaluar la capacidad enzimática de las bacterias, su tipo de metabolismo, su respiración aerobia o anaerobia y su asimilación de diversas fuentes de carbono. Desafortunadamente, existe una gran variación o distribución de la actividad enzimática presente en las diferentes especies de *Streptomyces* [3], en la actualidad, el uso de pruebas bioquímicas como ayuda taxonómica no ha sido establecido formalmente. En el caso de la asimilación de diferentes fuentes de carbono, el empleo de un kit de pruebas bioquímicas resulta de gran ayuda, pues se pueden observar de manera cualitativa las fuentes de carbono que cada especie es capaz de asimilar.

Entre las diversas fuentes de carbono existentes, los microorganismos son capaces de degradar las sencillas (como la glucosa), e inclusive, algunos también poseen la capacidad de emplear las complejas, como la celulosa y el almidón.

Análisis quimiotaxonómico. La quimiotaxonomía es una herramienta que permite efectuar la identificación y clasificación de los microorganismos, de acuerdo con las diferencias o similitudes que presentan en su composición bioquímica. En este tipo de estudio se puede realizar el análisis de componentes celulares tales como los aminoácidos, lípidos, azúcares, etc. Los actinomicetos se caracterizan por tener una pared celular con una composición particular, por lo que su análisis resulta relevante para el proceso de identificación [3].

Para el caso de *Streptomyces*, se ha encontrado que poseen grandes cantidades de ácido L-diaminopimérico en su pared celular. Dentro de sus componentes celulares, también se han encontrado, aunque en menores cantidades, ácidos grasos de 14-18 átomos de carbono e incluso metil ésteres hidroxilados [3]. Sin embargo, el principal componente que se emplea para su clasificación, es el ácido diaminopimérico, ya con él es posible diferenciar al género de otras bacterias con características morfológicas similares como el caso de *Nocardia*.

Análisis Genético. La secuencia del DNA que codifica para el RNA ribosomal (rRNA) constituye una herramienta ampliamente utilizada para establecer la

taxonomía de los estreptomicetos. La comparación de la secuencia del rRNA ha sido empleada para ubicar a las bacterias en una determinada especie, o incluso, para asignarles género. Dentro de la secuencia de DNA que codifica para el rRNA 16S se encuentran 3 regiones: α , β y γ . Las dos primeras se consideran género específicas, mientras que la región gamma posee una mayor variabilidad que permite determinar la especie. Una ventaja de este estudio reside en la gran cantidad de secuencias de esta porción de DNA reportadas en bases de datos, contra las cuales se pueden comparar las de las cepas aisladas [37].

Un estudio realizado en 1997 por Kataoka *et al.*, demostró que estas secuencias pueden ser utilizadas para determinar la relación existente entre las diferentes especies del género *Streptomyces*.

DNA ribosomal 16S como herramienta filogenética en la taxonomía de bacterias

Los ribosomas bacterianos 70S pueden disociarse en dos subunidades: la 50S y la 30S. Ésta última formada a su vez por el rRNA 16S y 21 proteínas diferentes (fig 1.2).

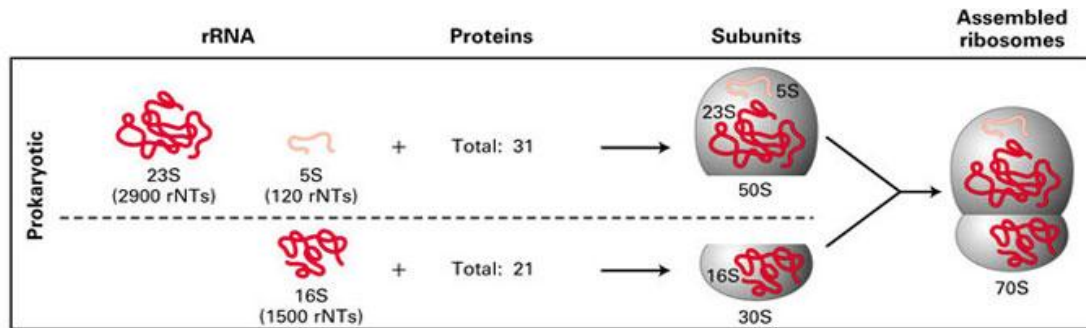


Figura 1.2 Ribosoma bacteriano. Macromoléculas, estructuras y subunidades que lo componen. S: coeficiente de sedimentación=valor Svedberg [54].

El rRNA 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 nucleótidos y está codificado por un gen, llamado *rrs*, al que también se le conoce como DNA ribosomal 16S. La estructura secundaria de la secuencia del rRNA 16S se caracteriza por presentar segmentos de doble cadena que se alternan con secuencias de cadena sencilla (fig 1.3) [33].

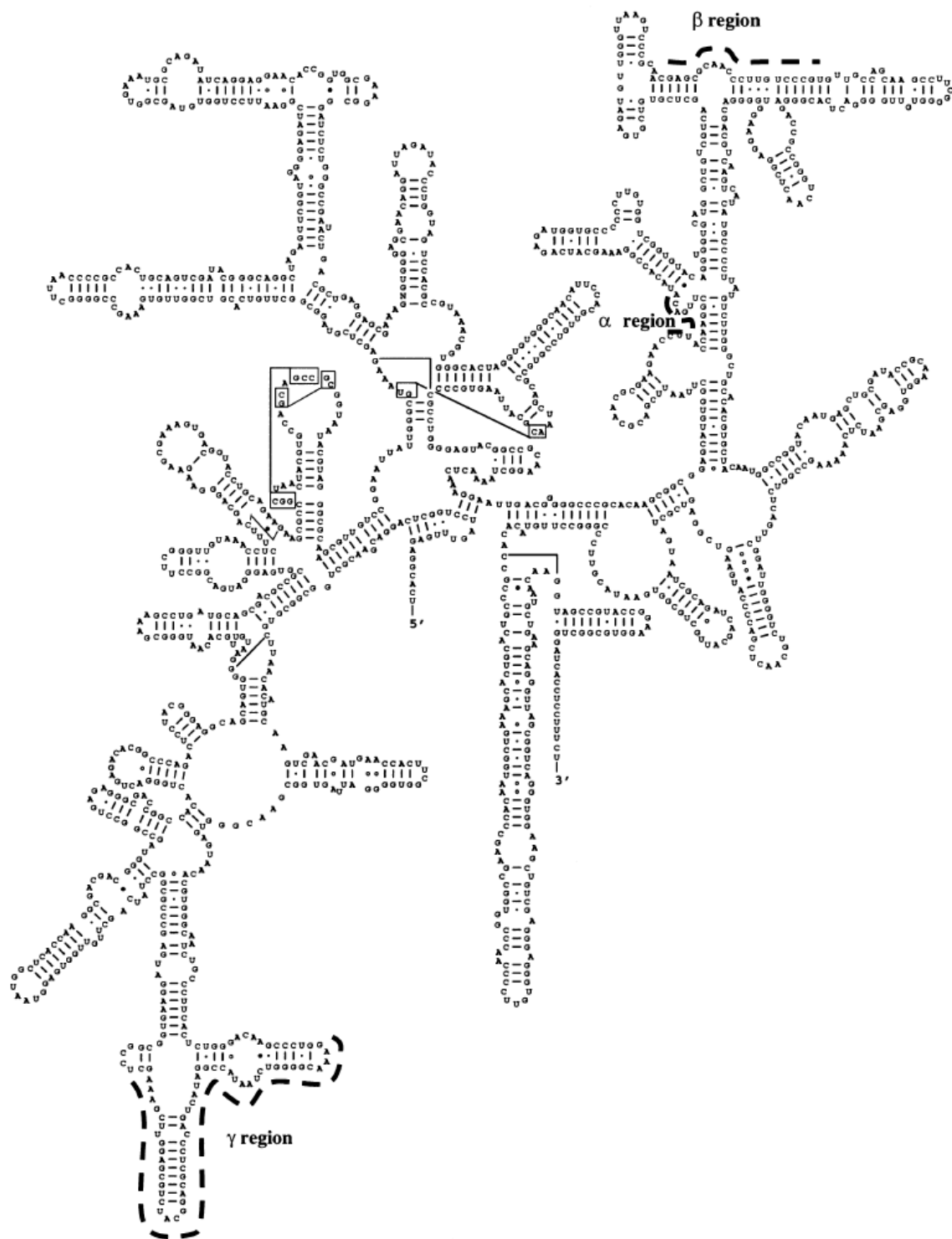


Figura 1.3 Estructura secundaria del rRNA 16S de *Streptomyces coelicolor*. Annaliesa S. Anderson. Int. J. Sys Evol Microbiology (2001), 51.

Esta macromolécula fue estudiada por Woese en 1987, quien determinó las siguientes características que permiten su utilización como herramienta filogenética y taxonómica [33]:

- Es una molécula muy antigua que está presente en prácticamente la totalidad de las bacterias.
- Tanto su función como su estructura no han sufrido modificaciones a lo largo del tiempo, por lo que se trata de una estructura altamente conservada.
- A pesar de que la estructura se mantiene estable por largos periodos de tiempo, presenta una variabilidad suficiente para poder diferenciar entre microorganismos, tanto en su género como en su especie.
- La cantidad de nucleótidos estudiados (1 500) reduce las variaciones que pueden tener importancia, estadísticamente hablando.
- La conservación en su estructura secundaria puede ser de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso.
- Las bases de datos son amplias debido a la facilidad para secuenciar esta molécula.

El grado de similitud entre las secuencias de los rDNA 16S permite distinguir entre dos bacterias, además de que hace posible construir árboles filogenéticos

y colocar a los no implicados en el casillero correspondiente del contexto evolutivo.

Generalidades del género *Streptomyces*

Streptomyces es un género ubicado en el orden *Actinomycetales*, perteneciente a la clase de las *actinobacterias*, ya que son bacterias aerobias, Gram-positivas, con un contenido de G + C dentro de su DNA del 69-78 mol%. Producen micelio vegetativo ramificado de aproximadamente 0.5 - 1.0 μm de diámetro, así como micelio aéreo, el cual, al envejecer la colonia, desarrolla cadenas de esporas que posteriormente se separan [17].

Macro y Micromorfología de *Streptomyces*. Los estreptomicetos son microorganismos con una micromorfología muy particular, ya que esta varía dependiendo del ciclo de vida en que se encuentran.

Su ciclo de vida inicia (Fig. 1.4) con la germinación de una espora que produce uno o más filamentos multinucleados; durante esta etapa existe replicación del DNA sin que se produzca división celular, lo que da lugar a la formación de estructuras filamentosas o micelio vegetativo. Posteriormente da paso al micelio aéreo que poco a poco se va septando, produciendo las esporas que fungen como la forma de resistencia y reproducción del microorganismo [17].

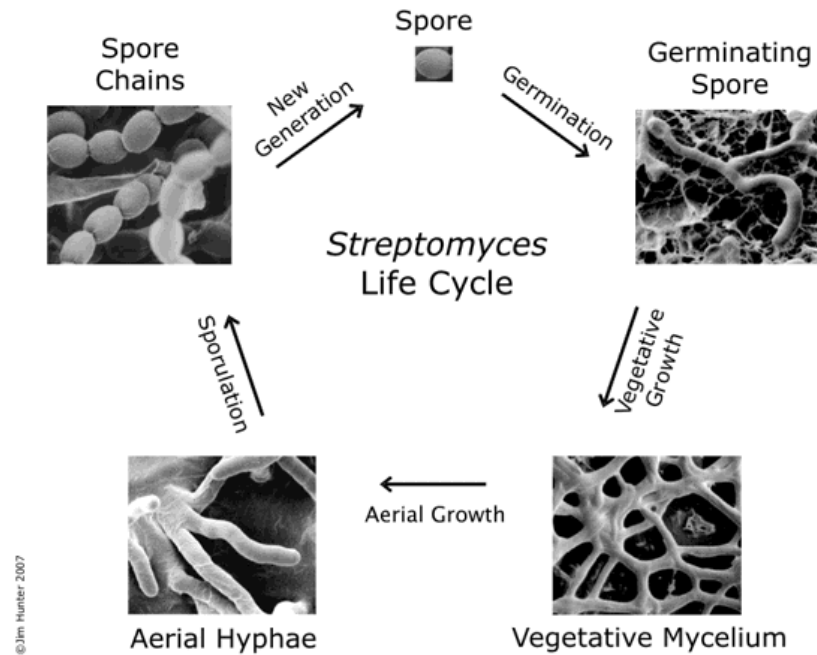


Figura 1.4 Ciclo de vida de los *Streptomyces* (Jim Hunter 2007).

Durante el desarrollo del micelio aéreo se lleva a cabo la producción de los metabolitos secundarios, los cuales están asociados a la escasez de nutrientes y, por ende, a las condiciones de estrés a las que es sometido el microorganismo, y que da origen a las esporas necesarias para poder sobrevivir. La esporulación es una característica general y consistente de *Streptomyces*, por lo que es ampliamente utilizada en su taxonomía. Pridham *et al.*, en 1958 propusieron un esquema que fue adoptado por el International *Streptomyces* Project, el cual reconoce cuatro tipos de superficie de esporas: lisa, verrugosa, espinosa y filamentosa (fig. 1.5).



Figura 1.5. Tipos de superficie de esporas de *Streptomyces*. (Shirling & Gottlieb, 1966)

Las características morfológicas del micelio aéreo son de mayor utilidad que las del micelio vegetativo; de aquellas se puede obtener información como el color de la colonia, la configuración de la cadena de esporas, la forma y la superficie de las propias, lo que constituye una ayuda para diferenciar entre especies. En general, *Streptomyces* forma colonias liquenoides o rugosas que inicialmente son de superficie relativamente lisa y uniforme aunque, conforme pasa el tiempo se tornan rugosas y con una apariencia granular o polvosa, debido a la formación de esporas [5].

Composición celular. Estas bacterias son Gram-positivas y no ácido-alcohol resistentes. Su peptidoglicano contiene grandes cantidades de ácido L-diaminopimérico. Dentro de los componentes de estos microorganismos, también existen sustancias como la glicina, alanina, ácido glutámico y lípidos, entre los cuales se encuentran el difosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol. En general, no presentan azúcares característicos en su pared celular, aunque en algunos casos se puede encontrar ribosa en los hidrolizados celulares [38].

Streptomyces en el ecosistema del suelo. Los microorganismos que forman parte de este género, tienen un metabolismo oxidativo y emplean una amplia variedad de compuestos orgánicos como fuente de carbono. Estos microorganismos están ampliamente distribuidos y son abundantes en suelo, incluso en las compostas.

Se ha sugerido que los estreptomicetos participan en el proceso de descomposición de los componentes del suelo debido a su capacidad de producción de enzimas hidrolíticas [51].

Los estreptomicetos como microorganismos productores de metabolitos de interés industrial. Estas bacterias poseen importancia en el ámbito industrial y biotecnológico debido a su capacidad para producir metabolitos secundarios como los antibióticos, antitumorales inmunosupresores, hipocolesterolémicos, herbicidas e incluso proteínas recombinantes [12].

El término de metabolito secundario se le ha aplicado a las rutas biosintéticas y a los productos que aparecen en algunas especies y que no son indispensables en los procesos vitales del microorganismo. Se piensa que la ruta bioquímica por la cual son producidos puede ser más importante que los metabolitos en si; sin embargo, esto no está confirmado, por lo cual la importancia de los metabolitos secundarios para las células mismas pudiera ser el mantener los mecanismos de la reproducción celular activos.

El mejoramiento genético de las cepas permite obtener una mayor cantidad del metabolito secundario de interés; un producto ligeramente diferente en su

estructura, pero con la misma actividad o inclusive, un metabolito diferente que por ende puede tener una actividad distinta; como ejemplo, podemos mencionar a *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, que es una mutante de la cepa *Streptomyces peucetius*; ésta última produce un agente antitumoral llamado daunorrubicina, mientras que la primera produce también un agente antitumoral llamado doxorubicina, la cual presenta una mejor actividad contra tumores.

Sin embargo, estos descubrimientos han llevado a una búsqueda extensiva de nuevos compuestos bioactivos, provocando que se describieran muchas especies nuevas por el simple hecho de producir nuevos productos, a pesar de que muchas de ellas estaban estrechamente relacionadas o pertenecían a la misma especie [3].

La identificación correcta de cepas pertenecientes al género *Streptomyces* es importante debido a que son productores de metabolitos secundarios con potencial aplicación en la industria. Si el microorganismo resultante es una nueva especie, esto abre un campo de investigación en cuanto al tipo de compuestos producidos, para determinar su naturaleza, así como su efectividad.

Aislamiento de la cepa K-155 de *Streptomyces*

El presente trabajo tiene como antecedente la investigación realizada por Catalina Cárdenas que lleva como título: “Evaluación del uso biotecnológico de la semilla de *Ditaxis heterantha* para la producción de Safranal”, donde se realizó una búsqueda de microorganismos capaces de emplear la heteranthina como fuente de carbono.

La heteranthina es un compuesto aislado de la semilla de *Ditaxis heterantha*, el cuál es un carotenoide que presenta dobles enlaces conjugados susceptibles a la oxidación con la posible generación de componentes con aroma [7].

Debido a que a partir de la heteranthina se esperaba obtener la molécula de safranal por degradación microbiológica, se efectuó la búsqueda de microorganismos capaces de crecer en medios de cultivo con esta sustancia como única fuente de carbono.

Lo primero que se realizó fue exponer la semilla de *Ditaxis heterantha* molida, durante 15 días en tierra de jardín. Pasado este tiempo, se tomó una muestra de la tierra para aislar microorganismos presentes por el método de diluciones seriadas y siembra en cajas Petri.

Se emplearon medios de cultivo para aislar cualquier tipo de microorganismo capaz de emplear la heteranthina como fuente de carbono. Por la misma razón,

se incubaron las cajas Petri a 29 y 37°C para manejar diferentes condiciones y obtener el mayor número de microorganismos posible.

Los microorganismos seleccionados fueron aquellos que crecieron en el medio de cultivo sólido y produjeron halos de degradación de la heteranthina.

Como resultado se obtuvo un microorganismo que presentó un halo bien definido de aparente degradación de heteranthina a las 72 h en incubación a 29°C. A este microorganismo se le denominó K-155 (Fig. 1.6)

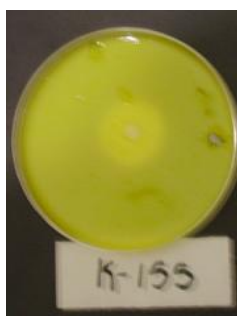


Figura 1.6 Halo de aparente degradación de heteranthina por las cepa aislada de tierra de jardín. (Cárdenas, 2009)

Este microorganismo fue seleccionado para llevar a cabo los experimentos de degradación de heteranthina en medio de cultivo líquido, sin embargo, no se encontró degradación del compuesto por este microorganismo en medio líquido. El halo que se observó en medio sólido se debía a la presencia de agarasas, lo cual se confirmó realizando una prueba en medio basal salino (MBS) sólido, donde la única fuente de carbono fue el agar. La cepa k-155 mostró producción

de agarasas, reveladas con yodo observándose halos de degradación formados alrededor del crecimiento de la colonia como se muestra en la figura 1.7.

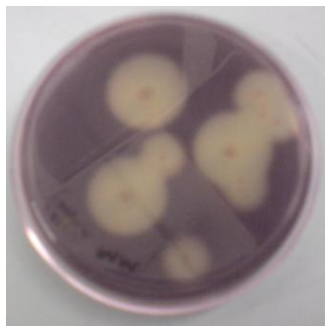


Figura 1.7 Halos de degradación de agar producidos por K-155.

Por otra parte, la identificación preliminar de K-155 se realizó amplificando por PCR el DNA que codifica para el RNA ribosomal 16S.

Se realizó una comparación de la secuencia obtenida empleando la base de datos del National Center for Biotechnology Information, y se encontró que la cepa K-155 pertenece al género *Streptomyces*. Dicha comparación también mostró una identidad del 98% con las cepas de *Streptomyces thermocarboxydus* y *Streptomyces aureus*. Sin embargo, debido a que se trataba de una secuencia parcial del DNA ribosomal 16S se decidió realizar un análisis más detallado de la cepa, así como obtener la secuencia completa del DNA ribosomal 16S para realizar nuevamente la comparación.

II. DISEÑO EXPERIMENTAL

En el presente trabajo se estudió la cepa bacteriana denominada como *Streptomyces* K-155. A la par se llevó a cabo una comparación de K-155 con las cepas de *Streptomyces* más cercanas a ésta (*S. aureus* y *S. thermocarboxydus*). Para ello, se empleó un enfoque polifásico, en el cual se realizaron estudios que incluyeron pruebas morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, quimiotaxonómicas y genéticas.

Conservación de microorganismos

Streptomyces K-155 se recuperó a partir de un liofilizado. La ampollita que contenía dicho liofilizado se rompió en esterilidad dentro de una campana de flujo laminar. El contenido se resuspendió en 0.3 mL de medio YMG (extracto de levadura 0.4%, extracto de malta 1% y glucosa 0.4%). De esta suspensión se tomaron 0.1 mL y con ellos se inocularon por duplicado, matraces Erlenmeyer bafleados de 250 mL con 50 mL de medio YMG. Los matraces se incubaron a 29°C con agitación (180 rpm). El 0.1 mL restante se inoculó en una caja Petri con agar YEME (extracto de levadura 0.3%, extracto de malta 0.3%, peptona 0.5%, glucosa 1% y agar 1.5%).

Las cepas de *Streptomyces aureus* 41784 y *Streptomyces thermocarboxydus* 44293 se obtuvieron de la colección DSM (Deutsche Sammlung von

Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany) y fueron previamente crecidas y almacenadas en Agar manitol. Por lo tanto de cada caja Petri con agar manitol se tomaron varias asadas y con ellas se inocularon matraces Erlenmeyer bafleados de 250 mL, cada uno con 50 mL de medio TSB (caldo de soya hidrolizada, Difco). De igual manera fueron incubadas a 29°C, 180 rpm.

Una vez que las 3 cepas presentaron crecimiento (48-72 h) se verificó que se tuvieran cultivos puros de *Streptomyces*, estriando una asada de cada cultivo en agar TSB y observando los cultivos en un microscopio óptico empleando una tinción de Gram. Cuando se obtuvieron cultivos puros, éstos se sembraron bajo las condiciones de cultivo mencionadas y se incubaron por 48 h a 29°C y 180 rpm.

Los cultivos se cosecharon y centrifugaron a 6 000 rpm por 10 min y cada uno se resuspendió en 10 mL de solución salina isotónica estéril (SSI). Con esta suspensión se inoculó 1 mL por caja Petri con agar MS (Soya-Manitol) para *S. aureus* y K-155 y agar YMG para *S. thermocarboxydus*.

Cosecha de esporas

Las esporas se colectaron a partir de las cajas Petri que presentaban crecimiento con esporulación uniforme. La técnica empleada se describe a continuación:

1. Colocar 3 mL de SSI estéril sobre el crecimiento en las cajas Petri.
2. Raspar las esporas de la superficie con ayuda de un asa bacteriológica realizando movimientos de estría masiva.
3. Colectar la suspensión con una pipeta estéril y vaciarlas en un tubo de centrífuga.
4. Añadir otros 3 mL de SSI estéril a la caja Petri y volver a raspar.
5. Transferir esos 3 mL a otra caja Petri con esporulación y raspar de la misma manera que en el paso 2.
6. Colectar esos 3 mL, junto con los del paso 3, en el tubo de centrífuga.
7. Agregar 3 mL más de SSI estéril y repetir los pasos del 4 al 6 y, así sucesivamente, con cada caja Petri con esporulación.
8. Filtrar todo el volumen colectado a través de trampas para esporas.
9. Añadir más SSI estéril sobre las trampas para limpiar el empacado y obtener la mayor cantidad posible de esporas.
10. Centrifugar el filtrado a 5 500 rpm.
11. Decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento en glicerol al 20% estéril (el volumen depende de la cantidad de esporas colectadas).
12. Preparar alícuotas en tubos de 1.5 mL con 500 μ L cada uno.

Estas alícuotas representaron el stock del cual se partió para realizar cada experimento.

Conteo de esporas

Para tener una aproximación del número de esporas inoculadas de cada cepa y realizar los ensayos lo más uniformemente posible, se realizó una cuenta de esporas.

Del stock de esporas en glicerol se prepararon diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) en una solución Tween 80 al 1%.

De cada dilución se tomaron 10 μ L y se colocaron en una cámara de Neubauer, para leer en un microscopio óptico; la lectura se realizó con la siguiente metodología:

Tanto la cámara como el cubreobjetos o laminilla deben estar limpios, secos y libres de grasa.

1. La cámara se llena con micropipeta 10 μ L.
2. Se coloca la cámara sobre la platina del microscopio, se ajusta y se observa con el objetivo de 10X. De esta manera, se observa la imagen mostrada en la figura 2.1.

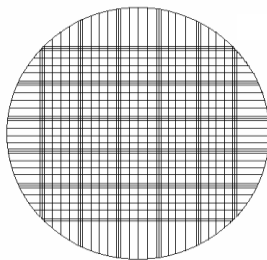


Figura 2.1. Ilustración de la cámara de Neubauer vista en objetivo 10X.

3. Se observan 25 cuadros los cuales se pueden contar siguiendo el orden de las flechas (Fig 2.2.) para evitar contar un cuadro 2 veces, o contar únicamente las células presentes en 5 cuadros (los extremos y el central). Para realizar el conteo se emplea el objetivo de 40X.

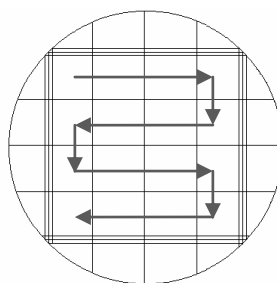


Figura 2.2. Ilustración de la cámara de Neubauer vista con el objetivo de 40X; las flechas indican el sentido en que debe hacerse el conteo.

4. Se suma el número de esporas y se multiplica por la dilución empleada y por un factor igual a 10^4 si se contaron los 25 cuadros. Este es el factor de corrección para llevar la cuenta a 1 mL tomando en cuenta el volumen ocupado por la cámara.

$$\frac{\# \text{ esporas}}{\text{mL}} = \# \text{ esporas}(25 \text{ cuadrantes}) * \text{ dilución } * 10^4$$

Análisis morfológico

Crecimiento en diferentes medios de cultivo

Para observar el tipo de crecimiento así como la producción de micelio aéreo y de pigmentos solubles, se emplearon diferentes medios de cultivo sólido recomendados por el International *Streptomyces* Project (ISP) y se siguieron las técnicas descritas por Shirling and Gottlieb (1966).

Los medios empleados fueron los siguientes:

- Agar Extracto de Triptona-Levadura (ISP-1)
- Agar YMG (ISP-2)
- Agar Avena (ISP-3)
- Agar Almidón-Sales inorgánicas (ISP-4)
- Agar Glicerol-Asparagina (ISP-5)

La inoculación se realizó por estría masiva de una asada proveniente de un cultivo en medio sólido con esporulación abundante (MS para K-155 y *S.aureus* y YMG para *S. thermocarboxydus*).

Los cultivos se incubaron a 29°C y se revisaron a los 7, 14 y 21 días para documentar la producción de micelio aéreo, su color y la producción de pigmentos solubles.

Observación al microscopio electrónico

Para realizar esta observación las 3 cepas se crecieron en Agar Nutritivo Difco y se incubaron por una semana para que esporularan. Pasado este tiempo se cortó una porción de agar, de aproximadamente 0.5 cm², la cual se deshidrató colocándola en etanol al 50% por 8 h aproximadamente, después en etanol al 60% y así sucesivamente, hasta añadirle etanol al 100%. Se lavó 2 veces con etanol al 100%. Se eliminó el agua restante por punto crítico con CO₂ en un equipo Samdri-795 (tousimis E.U.A.). Posteriormente se montó con pintura de plata y finalmente se le dio un recubrimiento con oro empleando el equipo “JEOL JF-1100 ion sputter” (JEOL E.U.A.) para asegurar una superficie lisa y un flujo correcto de los electrones. Las fotos fueron tomadas con el microscopio electrónico JEOL JSM-6360LV Scanning Electron Microscope (JEOL E.U.A.).

Análisis fisiológico

Los experimentos fueron realizados por triplicado para cada cepa de *Streptomyces*.

Efecto del pH

Para verificar el efecto del pH sobre el crecimiento de las tres bacterias, se prepararon matraces bafleados de 250 mL con 50 mL de medio TSB. Los matraces fueron ajustados a valores de pH 4, 5, 6 y 7 utilizando HCl 1N. Los matraces a pH 8, 9 y 10 fueron ajustados con NaOH 1N después de su esterilización.

Los matraces bafleados de 250 mL con 50 mL de medio fueron inoculados con 100 μ L de la suspensión de esporas en glicerol previamente preparada y se incubaron por 48 h a 29°C 180 rpm.

Determinación de la Biomasa (peso seco)

Los matraces se retiraron de incubación a las 48 h y los cultivos se centrifugaron a 5500 rpm por 10 min. Se decantó casi todo el sobrenadante dejando aproximadamente 5 mL en los que se resuspendió la biomasa. Esta suspensión fue filtrada a través del sistema Millipore (Fig. 2.3.) empleando filtros Millipore de celulosa de 0.45 μ m de diámetro del poro. Estos filtros fueron previamente puestos a peso constante a 70°C.

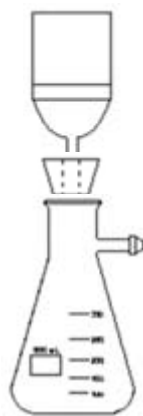


Figura 2.3. Esquema del sistema de filtración Millipore.

Una vez filtrados los sobrenadantes, los filtros con la biomasa se secaron a peso constante a 70°C por una noche para evaporar el resto del sobrenadante.

El cálculo de la biomasa se realizó con la diferencia entre el peso del filtro con biomasa y el peso del filtro sin biomasa. Posteriormente se graficaron los datos para obtener una curva de pH contra crecimiento.

Efecto de la temperatura

Para establecer el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de las 3 cepas de *Streptomyces*, se prepararon matraces bafleados de 250 mL con 50 mL de medio TSB. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada una de las siguientes temperaturas: 29, 37, 45, 50 y 52°C. Al igual que en el caso anterior, cada matraz se inoculó con 100 µL del stock de esporas y se incubó por 48 h a 180 rpm. Una vez pasado el tiempo de incubación, se determinó biomasa por peso seco.

Tolerancia al NaCl

La tolerancia a NaCl de los microorganismos, se determinó adicionando al medio TSB 4, 7, 10 y 13% de NaCl. Se inocularon los matraces con 100 µL del stock de esporas y se incubaron por 48 h a 180 rpm. Una vez pasado el tiempo de incubación, se determinó biomasa por peso seco.

Análisis bioquímico

Este análisis se llevó a cabo en dos partes.

Uso de fuentes de carbono en medio sólido

En esta primera etapa se analizó la capacidad de las 3 cepas de *Streptomyces* para degradar fuentes de carbono como el almidón, la caseína y la celulosa en medio sólido. Para ello se elaboró el Medio Basal Salino (MBS) que contiene únicamente un porcentaje bajo de extracto de levadura (0.05%) para inducir el crecimiento y elementos traza (Anexo 1). La fuente de carbono a probar se adicionó a este medio y se esterilizó en autoclave. En el caso del almidón se empleó almidón soluble al 1%; para la caseína se utilizó caseinato de sodio al 1%; mientras que la celulosa se empleó en dos de sus variedades, como carboximetil celulosa (CMC) al 0.5% y papel filtro Whatman No. 4. Este último, como una tira dentro de un tubo de ensayo de 16 x 22 mm con tapón de rosca con 20 mL de medio MBS líquido.

Las cajas Petri con agar fueron inoculadas por picadura y los tubos con el papel filtro con una asada, ambos de la suspensión de esporas.

Estas técnicas requieren un revelado para observar los halos de hidrólisis en el agar por el uso de la fuente de carbono. A continuación se presentan los métodos de revelado:

Revelado del uso del almidón

1. Se colocaron cristales de yodo sobre una caja Petri limpia.
2. La caja Petri con crecimiento se acomodó boca abajo sobre la caja que contiene yodo y se sellaron juntas.
3. Se dejó reposando por un tiempo para permitir la sublimación del yodo.
4. La hidrólisis se observa como un halo amarillo alrededor de la colonia y se distingue del color morado que adquiere el resto de la caja Petri.

Revelado del uso de celulosa

1. Se inundaron las cajas Petri con colonias aisladas de *Streptomyces*, con solución de rojo congo al 0.1% y se dejaron reposando por 10 min.

2. Se retiró el exceso de rojo congo y se agregó solución de NaCl 1 M inundando nuevamente las cajas Petri manteniéndolas aproximadamente 2 min con agitación suave.
3. El lavado con NaCl se repitió al menos 3 veces más o hasta que se observó el halo de hidrólisis.

El uso del papel filtro como fuente de carbono se determinó por el crecimiento de las cepas de *Streptomyces* sobre el papel.

Revelado del uso de caseína

Debido a que la caseína le confiere una apariencia turbia al medio, el halo de hidrólisis se observa sin necesidad de un agente revelador como una zona transparente alrededor de la colonia.

Pruebas bioquímicas (API 50CH)

La capacidad de *Streptomyces* para emplear diversos carbohidratos como única fuente de carbono fue evaluada con el kit API 50CH el cual consta de:

- 1 galería API50 CH con 50 microtubos divididos por secciones de 10
- 1 cámara de incubación
- 1 ampollita con 10 mL de medio API 50 CHB/E

Se siguió la metodología descrita en la ficha técnica. Sin embargo, el inóculo de cada cepa de *Streptomyces* se realizó a partir de la suspensión de esporas en glicerol. Se tomaron 500 μL de suspensión, se centrifugó a 10 000 rpm por 1 min y se separó el sobrenadante procurando retirarlo todo con ayuda de una micropipeta. El botón se lavó con SSI y se centrifugó nuevamente. Se separó nuevamente el sobrenadante y el botón se resuspendió en 500 μL de SSI.

Se abrió la ampolleta y se retiraron 100 μL de medio.

Se tomaron 100 μL de la suspensión de esporas en SSI y se añadieron al medio de cultivo de la ampolleta cuidando de mezclar bien.

La inoculación de la galería API 50CH se llevó a cabo según la ficha técnica:

1. Con ayuda de una pipeta o micropipeta y puntas estériles, se toma la suspensión de esporas en el medio.
2. Se reparte en los microtubos inclinando la cámara y cuidando que no se formen burbujas en el interior de los mismos y que todos tengan el mismo volumen llenando el microtubo hasta la primera línea (se señala con la flecha en la figura 2.4). Las cámaras se tapan y sellan para evitar contaminación.

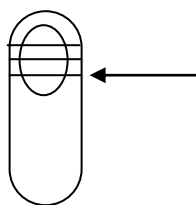


Figura 2.4. Ilustración de un microtubo de la galería API.

La incubación se realizó a 29°C y las galerías fueron revisadas cada 24 h hasta que hubo crecimiento de las cepas de *Streptomyces* y viraje en el color del medio. Finalmente se tomó lectura de los resultados y se documentó en la hoja de resultados incluida en el kit.

Análisis de la pared celular

Determinación de ácido diaminopimélico y carbohidratos

La pared celular está constituida por peptidoglucano, otros compuestos como el ácido diaminopimélico y carbohidratos tales como la ramnosa, manosa o glucosa. Para su determinación, se reporta el uso de cromatografía en papel (Staneck and Roberts, 1974). Para esta estimación se emplearon células de las tres cepas de *Streptomyces* cosechadas a 48 h de incubación.

Los cultivos se cosecharon por centrifugación a 6 000 rpm por 10 min y, posteriormente, se filtraron a través de papel Whatman No. 42, lavándolas 2 veces con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente. El procedimiento seguido para esta determinación fue el descrito por Staneck and Roberts (1974).

El análisis se basa en la determinación de ácido L-diaminopimélico de la pared celular por medio de hidrólisis ácida con HCl. La cromatografía se llevó a cabo en una hoja para TLC de celulosa (DC-Alufolien Cellulose, Merck); para la fase

móvil se empleo una mezcla de metanol – agua destilada - HCl 6 N – piridina (80:26:4:10). La cromatoplaca se reveló rociando con una solución de ninhidrina en acetona y se calentó en parrilla por 1 minuto.

La determinación de carbohidratos fue por medio de hidrólisis ácida con ácido sulfúrico. Se emplearon las mismas cromatoplacas de celulosa y se eluyó con una mezcla de n-butanol – agua destilada – piridina – tolueno (10:6:6:1). Se reveló con una solución ácida de ftalato de anilina y se calentó en parrilla por 3 minutos.

Análisis del DNA ribosomal 16S de *Streptomyces* K-155

Extracción de DNA genómico de Streptomyces

Para obtener el DNA ribosomal 16S se realiza primero una extracción del DNA total de *Streptomyces* con el siguiente procedimiento:

1. Se preparó un preinóculo en medio TSB líquido en matraces Erlenmeyer de 250 mL bafleados, con 50 mL de medio. Estos matraces se inocularon con 100 µL de la suspensión de esporas en glicerol y se incubaron por 48 h a 29°C, 180 rpm.
2. El contenido de un matraz se centrifugó a 6 000 rpm por 10 min.

3. Se decantó el sobrenadante, el botón de células se lavó con SSI, se resuspendió y se centrifugó nuevamente a 6 000 rpm por 10 min.
4. Se desechó el sobrenadante y se agregaron 5 mL de SSI.
5. Se inocularon 100 μ L de la suspensión anterior en un matraz Erlenmeyer de 250 mL bafleado con 50 mL de medio TSB + glicina 0.5%.
6. Se incubó por 24 h a 29°C y 180 rpm.
7. El cultivo se cosechó por centrifugación y se lavó agregando solución de sacarosa 10.3%, centrifugando nuevamente.
8. Se decantó el sobrenadante y el botón de micelio se resuspendió en amortiguador P más lisozima (2 mg/mL).
9. Se incubó por una hora a 30°C con agitación suave disgregando el micelio cada 15 min para formar protoplastos.
10. Después del tiempo de incubación se centrifugó 10 min a 6000 rpm y el botón se resuspendió en 10 mL de sacarosa 10.3%.
11. Se adicionaron 200 μ L de EDTA 0.5 M, pH 8 y 2 mL de SDS al 20%. Se mezcló cuidadosamente y se añadieron 10 mL de fenol y 15 mL de NaCl 5 M.
12. Se mezcló suavemente por 10 min.

13. A la mezcla se le adicionaron 10 mL de cloroformo, se agitó y se centrifugó por 10 min a 13 000 rpm.
14. Se recuperó la fase acuosa, se lavó con 10 mL de fenol y 10 mL de cloroformo mezclando bien y se centrifugó a 13 000 rpm por 10 min.
15. Nuevamente se recuperó la fase acuosa, se le añadió 1 volumen de isopropanol y se dejó precipitando en refrigeración por 1 h.
16. Mientras tanto se prepararon pipetas Pasteur para recuperar el DNA. Las pipetas se flamearon al mechero para redondear sus puntas en forma de gancho.
17. Con la punta de la pipeta se recuperó el DNA enrollándolo haciendo movimientos circulares.
18. Las pipetas con el DNA se dejaron secando a temperatura ambiente.
19. El DNA obtenido se redisolvió en amortiguador TE.
20. Se le adicionó RNasa a una concentración de 50 µg/mL y se incubó a 50°C por media hora.
21. Se adicionó pronasa a concentración de 100 µg y 40 µL de SDS al 10% por cada mL de solución. También se agregó NaCl 5 M (20 µL por cada mL de solución), y se incubó 1 h a 50°C.
22. Transcurrida la hora se limpió una vez con fenol:cloroformo (1:1) centrifugando 10 min a 13 000 rpm.

23. Se recuperó la fase acuosa y se le adicionó 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M más 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Se incubó 20 min a -20°C.

24. Se centrifugó nuevamente a 13 000 rpm por 10 min y se lavó el botón con 1 volumen de etanol al 70%.

25. El sobrenadante se decantó y se dejó secar el botón para finalmente resuspenderlo en agua milliQ.

26. Para conservarlo se precipitó nuevamente con 0.1 volumen de acetato de sodio y 2.5 volúmenes de etanol absoluto congelándolo a -30°C.

Una vez aislado el DNA genómico fue analizado por electroforesis en gel de agarosa. Así mismo, se determinó la concentración del DNA por espectrofotometría a 260 nm.

La concentración de DNA se obtiene con la siguiente ecuación

$$[DNA] = Abs_{260} * \epsilon * \frac{1}{dil} = \mu g / mL$$

Amplificación por PCR de la región del DNA ribosomal 16S

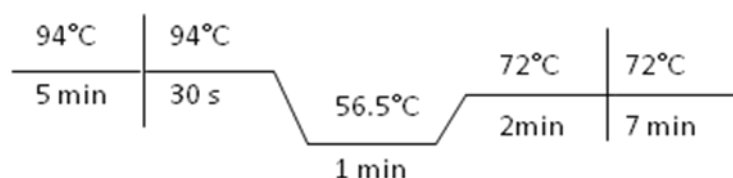
Una vez aislado el DNA genómico de *Streptomyces* y conociendo su concentración, se procedió a efectuar una PCR para amplificar el fragmento de

DNA que codifica para el RNA ribosomal 16S. Para esta reacción se emplearon los siguientes reactivos en las cantidades anotadas (Tabla 6.1):

Reactivo	Cantidad
DNA genómico de <i>Streptomyces</i> o DNA molde.	2.0 µL
Amortiguador 10X	5.0 µL
dNTP's	1.5 µL
Primer Fw	1.0 µL
Primer Rv	1.0 µL
DMSO (Dimetilsufóxido)	5.0 µL
MgCl ₂	3.5 µL
Amplificasa	0.8 µL
H ₂ O	30.2 µL
Volumen total	50 µL

Tabla 6.1 Reactivos empleados para realizar el PCR.

La reacción se llevó a cabo durante 25 ciclos bajo las siguientes condiciones:



Para corroborar el producto de PCR esperado (1 500 pb aproximadamente), se corrió nuevamente un gel de agarosa empleando un marcador de peso molecular de 1 kb de Promega.

Para obtener una mayor cantidad de DNA ribosomal 16S se realizó un segundo PCR de mayor volumen y cambiando de 25 a 30 ciclos.

De igual manera se verificó la correcta amplificación con una electroforesis en gel de agarosa. Se cortó el fragmento de gel que contenía la banda correspondiente al DNA de 1 500 pb. El fragmento de gel fue cortado en partes que contuvieran no más de 200 mg de agarosa cada uno y se colocaron en microtubos de 1.5 mL.

La extracción de DNA a partir del gel se llevó a cabo con el kit de extracción rápida de gel de Marligen Bioscience Inc. (catálogo No. 11456-019).

Clonación de la región del rDNA 16S en E. coli

El amplificado de rDNA de *Streptomyces* extraído se unió al vector pGEM - TEasy empleando el kit de Promega pGEM – TEasy Vector System Catálogo #A1360. (Fig. 2.5.)

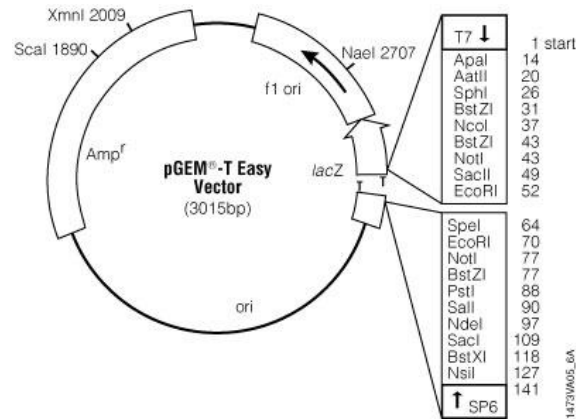


Figura 2.5. Mapa circular del vector pGEM – TEasy y puntos de referencia de la secuencia.

La reacción se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del sistema, empleando la reacción estándar y un control positivo (incluido en el sistema) y dejándola toda la noche para incrementar el producto de la unión del plásmido con la secuencia de DNA ribosomal 16S. Una vez pasada la incubación, la transformación fue realizada en células electrocompetentes de la cepa DH5α de *E. coli*.

Las células electroporadas fueron posteriormente plaquedas en cajas Petri con Agar Luria Bertani (LB) + ampicilina + IPTG + X-gal. A las 12 horas se revisó el crecimiento de las células de *E. coli* que contenían el plásmido, diferenciándolas por el color blanco de la colonia.

El cultivo se revisó a las 12 h para observar el crecimiento de las clonas de *E. coli* que contuvieran el plásmido. Para verificar el tamaño de los plásmidos

obtenidos se realizó una preparación de los plásmidos extraídos de las células por lisis alcalina.

De las colonias crecidas en el medio LB + ampicilina + X-gal + IPTG se inocularon tubos con 5 mL de medio LB + ampicilina con una colonia cada uno.

Se incubaron toda la noche a 37°C con agitación a 200 rpm. Con este cultivo se llevó a cabo la siguiente metodología:

1. 1 mL del cultivo se pasó a un microtubo de 1.5 mL y se centrifugó a 6 000 rpm por 10 min a una temperatura de 4°C.
2. Se descartó el sobrenadante cuidando que no quedaran restos del medio de cultivo. Se adicionaron 100 µL de solución I (ver anexo) y se agitó suavemente por 5 min a temperatura ambiente.
3. Se añadieron 200 µL de solución II (ver anexo) mezclando por inversión del tubo y se incubó en hielo 5 min.
4. De la solución III preenfriada se adicionaron 150 µL y se incubó por 10 min en hielo.
5. Pasados los 10 min se centrifugó por 15 minutos a 10 000 rpm, el sobrenadante se traspasó a otro tubo de 1.5 mL y se le añadió 1 mL de isopropanol.
6. Se incubó 15 min a temperatura ambiente.

7. Nuevamente se centrifugó a 10 000 rpm ahora por 10 min. El botón se lavó con 1 mL de etanol al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente.
8. El botón se resuspendió en 500 µL de amortiguador TE (ver anexo) y se le adicionó RNasa a una concentración de 50 µg/mL.
9. Se incubó por 1 h a 37°C
10. Para limpiarlo se empleó un volumen de fenol:cloroformo (1:1), se agitó por inversión y se centrifugó a 10 000 rpm por 5 min.
11. La fase acuosa se recuperó en un tubo limpio.
12. Se lavó 2 veces con un volumen de cloroformo.
13. Enseguida se agregaron 0.1 volumen de NaCl 1 M y 1 volumen de isopropanol
14. Por último se centrifugó a 10 000 rpm por 10 min, se decantó el sobrenadante y se lavó el botón de ácidos nucleicos con 1 mL de etanol al 70%. Se dejó secar y se resuspendió finalmente en 20 µL de agua destilada.

Para verificar la integridad del plásmido en la muestra se realizó una electroforesis en gel de agarosa. Así mismo, se realizó una digestión con la enzima *Eco RI* para verificar la presencia del amplificado. Para lo anterior se puso una mezcla de reacción según la tabla 6.2 y se dejó en incubación por una hora.

Reactivo	Volumen
Plásmido	3 µL
Amortiguador 10X	1 µL
EcoRI	1 µL
H ₂ O destilada	5 µL
Volumen total	10 µL

Tabla 6.2. Reactivos empleados para la digestión del plásmido con la enzima ECO-R1.

Una vez que se confirmó la construcción de la secuencia de DNA ribosomal 16S por electroforesis en gel de agarosa, se determinó nuevamente la concentración de DNA y se envió a secuenciar.

La secuencia obtenida se comparó contra las secuencias de DNA ribosomal 16S empleando la base de datos del National Center of Biotechnology Information (NCBI) y del Ribosomal Database Project (RDP).

Determinación de la actividad antibiótica de la cepa K-155 de *Streptomyces*.

Se realizó un análisis cualitativo para evaluar la capacidad de la cepa K-155 de inhibir el crecimiento de los siguientes microorganismos:

- *Bacillus subtilis*
- *Micrococcus luteus*
- *Candida albicans*
- *Saccharomyces cerevisiae*

Para efectuar este análisis, primero se estrió una muestra de *Streptomyces* K-155 sobre la placa de agar nutritivo, como se muestra en la figura 2.6., y se dejó crecer por 10 días a 29°C.

Transcurridos los 10 días se inocularon las cepas de prueba por estría perpendicular a la de *Streptomyces* (Fig. 2.6.).

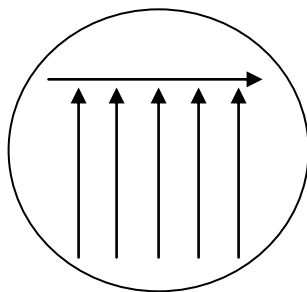


Figura 2.6. Esquema de las estrías realizadas para inocular las cepas de prueba en el ensayo de antibiosis

Se incubaron nuevamente a 29°C por 24 h para observar el crecimiento de las cepas de prueba.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Reactivación de las cepas

Las 3 especies de *Streptomyces* se recuperaron aproximadamente a los 7 días de haberlas inoculado, ya que todas requieren de un medio de cultivo rico en nutrientes y de aproximadamente una semana para crecer después de haber sido conservadas por un lapso prolongado.

Dado que las 3 especies provenían de diferentes formas de conservación, pudimos observar que el liofilizado es la mejor forma de conservar una muestra por un tiempo prolongado, ya que al permanecer deshidratado y sellado es menos propenso a sufrir contaminación. Por el contrario, en la conservación en placas de agar las células consumen los nutrientes, inician la fase de muerte y los cultivos son más susceptibles de contaminarse.

Después de recuperar las cepas, se procedió a sembrar los microorganismos en medios que favorecen su esporulación y la conservación de las esporas. *Streptomyces* K-155 y *S. aureus* produjeron una cantidad abundante de esporas de color gris en el medio MS, mientras que *S. thermocarboxydus* produjo una menor cantidad de esporas en este medio; por ello, se sembró en agar YMG, en donde se obtuvo una mejor esporulación, aunque no tan eficaz como la de las otras dos cepas, pero sí de color gris.

Las 3 especies fueron conservadas como suspensión de las esporas en glicerol al 20%.

La cantidad de esporas recolectadas se determinó haciendo una cuenta en la cámara de Neubauer. De esta determinación, para la cepa K-155 se obtuvo una concentración de esporas de 6×10^{10} , para *S. aureus* de 5.82×10^{10} y para *S. thermocarboxydus* de 4.6×10^9 .

Con los datos anteriores se determinó el volumen que se debía emplear en cada experimento, con el fin de contar con un inóculo ajustado que nos permitiera tener aproximadamente el mismo número de esporas en cada ocasión. Para *S. aureus* y K-155, el inóculo en los diversos experimentos fue de 100 μ L por matraz y, para *S. thermocarboxydus*, de 300 μ L por matraz, obteniendo así un inóculo del orden de 10^9 esporas/mL.

La diferencia en la producción de esporas entre *S. thermocarboxydus* y las otras dos cepas puede deberse a que el medio de cultivo no es el óptimo para la producción de esporas de esta especie. También puede influir la temperatura de incubación, ya que al ser *S. thermocarboxydus* una especie termófila, quizá la esporulación se produzca a una temperatura mayor a 29°C. Sin embargo, este resultado nos muestra una diferencia importante entre la cepa K-155 y *S. thermocarboxydus*, ya que el medio apropiado para su esporulación no es el mismo.

Características fenotípicas

Crecimiento en diferentes medios de cultivo

El género *Streptomyces* puede crecer en una amplia variedad de fuentes de carbono; puede degradar carbohidratos sencillos como la glucosa o complejos como el almidón.

Se emplearon diferentes medios sólidos para observar el crecimiento de las 3 especies de *Streptomyces*, resultando el YMG como el mejor medio para crecer a K-155; sin embargo, este medio no resultó el idóneo para *S. aureus*. Por ello, se buscó un medio donde las 3 especies crecieran de forma abundante pero sobre todo, uniformemente, encontrándose que en agar TSB las 3 cepas crecían de manera semejante. De este modo, cuando no se requería de un medio específico para el experimento, los ensayos se realizaron usando este medio.

En los medios Triptona-Levadura (ISP-1) y agar Nutritivo también se observa un crecimiento similar y uniforme, sin embargo, al crecer las cepas en estos medios en su forma líquida, el crecimiento no fue tan abundante como en TSB, por ello se decidió emplear este último medio para realizar los ensayos.

Medio Agar	K-155	<i>S. aureus</i>	<i>S. thermocarboxydus</i>
Tryptona-Lev (ISP-1)	+	+	+
YMG (ISP-2)	+++	+	++
Avena (ISP-3)	+	+++	+
Almidón-Sales	+++	+++	++
Inorgánicas (ISP-4)			
Glicerol-Asparagina (ISP-5)	++	++	++
TSA	++	++	++
Nutritivo	++	++	++
MS	+++	+++	+

Tabla 3.1 Crecimiento de K-155 y otras especies de *Streptomyces* en diferentes medios de cultivo sólido.

Como se muestra en la tabla 3.1 existen diferencias respecto al crecimiento entre las 3 cepas de *Streptomyces*. Por ejemplo en Agar YMG, la cepa K-155 presenta un crecimiento abundante mientras que *S. aureus* prácticamente no crece y *S. thermocarboxydus* lo hace de manera escasa.

En el caso del medio ISP-3 se nota que *S. aureus* crece abundantemente, mientras que las otras dos cepas crecen de manera escasa.

En los medios almidón-sales inorgánicas y MS se observó un crecimiento abundante para K-155 y *S. aureus*, no así para *S. thermocarboxydus*.

Estas diferencias en el crecimiento de las 3 cepas de *Streptomyces* en medio sólido pueden indicarnos diferencias en cuanto a la utilización de nutrientes. Debido a que cada uno de los medios tiene una composición diferente, existen diversos elementos que pueden influir en el tipo de crecimiento, por ejemplo: el

tipo de fuente de carbono o de nitrógeno, la presencia o ausencia de elementos minerales, la disponibilidad de los sustratos o la capacidad de cada cepa para asimilar los componentes del medio, entre otros.

Características del micelio aéreo

Una característica del crecimiento de los estreptomicetos consiste en la formación de micelio, tanto vegetativo como aéreo. El micelio aéreo es capaz de segmentarse y producir esporas, las cuales, junto con el micelio, producen el color que se aprecia en la superficie del medio. Como se puede observar en la tabla 3.2, el color gris es el más común; sin embargo, es notorio que el color del micelio aéreo se ve influenciado por el medio de cultivo, por lo cual fue necesario emplear diversos medios recomendados por el ISP para observar las diferencias entre las 3 especies de *Streptomyces*.

Medio Agar	K-155	<i>S. aureus</i>	<i>S.thermocarboxydus</i>
Tryptona-Lev (ISP-1)	Blanco	Gris	Gris
YMG (ISP-2)	Gris	Gris	Blanco/Gris
Avena (ISP-3)	Gris	Gris	Blanco
Almidón-Sales	Gris	Gris	Blanco
Inorgánicas (ISP-4)			
Glicerol-Asparagina (ISP-5)	Blanco	Blanco	Café
TSA	Blanco/Gris	Gris	Blanco
Nutritivo	-	-	Gris
MS	Gris	Gris	Blanco

Tabla 3.2 Color del micelio aéreo producido por K-155 y otras especies de *Streptomyces* en diferentes medios de cultivo.

En la tabla anterior se observa que la cepa K-155 produce un micelio de color gris en los medios 1SP-2, ISP-3, ISP-4 y MS, al igual que *S. aureus*; no obstante, también se observan diferencias entre estas dos cepas en el caso del medio ISP-1. La comparación entre K-155 y *S. thermocarboxydus* presenta mayores diferencias, ya que en la mayoría de los medios (ISP-2, ISP-3, ISP-4 y MS), la segunda produce un micelio de color blanco, a diferencia de la cepa K-155 que produce un micelio de color gris; en el medio ISP-5, esta última crece de color blanco, mientras *S. thermocarboxydus* lo hace de color beige-café.

Se sabe que la composición del medio influye en el tipo de crecimiento y en el color del micelio aéreo producido por estas bacterias, por ello se usaron medios definidos por el International *Streptomyces* Project para determinar el color del micelio aéreo [5, 35]. Además, suponiendo que las 3 cepas pertenecieran a la

misma especie, se esperaría un comportamiento similar y que produjeran un micelio aéreo del mismo color cuando se cultivan bajo las mismas condiciones. Por lo tanto, este experimento arroja más resultados que nos muestran diferencias fenotípicas entre K-155 y las cepas de referencia.

Una diferencia más notoria se encontró cuando se observaron los pigmentos difusibles hacia el medio de cultivo, pues *S. aureus* produce pigmentos que van desde el color amarillo-naranja hasta el ocre, dependiendo del medio de cultivo, mientras K-155 produce pigmentos de color café oscuro y *S. thermocarboxydus* no produce pigmentos solubles (Fig 3.1 y 3.2). Así mismo, la superficie de las esporas producidas por cada especie resultó diferente (Tabla 3.3), como se puede observar en las fotografías tomadas al microscopio electrónico (Fig 3.3, 3.4 y 3.5).

Característica	K-155	<i>S. aureus</i>	<i>S. thermocarboxydus</i>
Pigmentos solubles	Café	Amarillo/ocre	No produce
Superficie de esporas	Lisa	Lisa	Rugosa

Tabla 3.3 Superficie de esporas y pigmentos solubles producidos por K-155 y otras especies de *Streptomyces*.

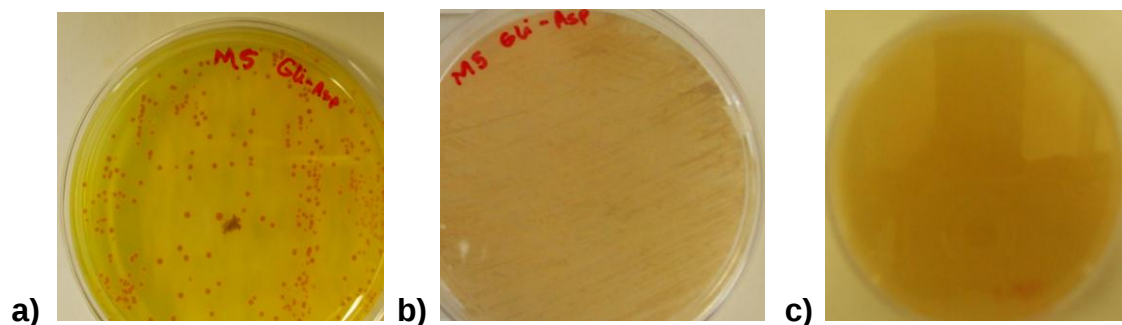


Figura 3.1 Pigmentos difusibles al medio Glicerol-Asparagina producidos por a) *S. aureus*, b) K-155 y c) *S. thermocarboxydus*.

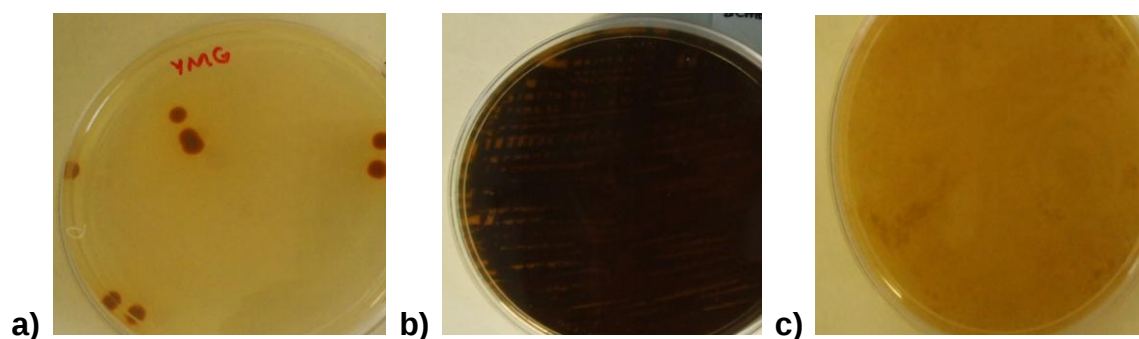


Figura 3.2 Pigmentos difusibles al medio YMG producidos por a) *S. aureus*, b) K-155 y c) *S. thermocarboxydus*.

Las imágenes anteriores nos muestran una diferencia importante entre las 3 cepas de *Streptomyces*. Como se muestra en la figura 3.1, *S. aureus* produce un pigmento de color amarillo intenso, mientras en la caja Petri con crecimiento de K-155 se observa un tono café claro y en la de *S. thermocarboxydus* no existe ningún pigmento y conserva el color del medio de cultivo. En la figura 3.2 el pigmento producido por K-155 es aún más notorio, pues se observa de un

color café oscuro; *S. aureus* produce un pigmento de color café, y nuevamente *S. thermocarboxydus* no produce pigmento.

Estos resultados concuerdan con los de la literatura, ya que *S. aureus* está reportada como productora de pigmentos naranjas y amarillos, mientras que *S. thermocarboxydus* no produce pigmentos [18, 26].

Por otra parte, esta característica nos indica que hay una diferencia en el metabolismo de las 3 cepas, ya que los pigmentos son metabolitos secundarios producidos por los microorganismos bajo condiciones determinadas, mismas que pueden tener alguna función. Por ejemplo, la piocianina producida por *Pseudomonas aeruginosa* que se origina a partir de las pioverdinas que actúan como sideróforos, para captar el hierro y transportarlo hacia interior de la célula [50]. En el caso de *Streptomyces*, se conoce la cepa de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* que produce la doxorrubicina, la cual, se observa como un pigmento rojo y posee actividad antitumoral [17].

Observación al microscopio electrónico

La observación al microscopio nos permitió diferenciar entre las tres cepas, para ello se crecieron en agar nutritivo, inoculando el medio a partir de la suspensión de esporas, se incubaron 7 días y se elaboraron las preparaciones. En la figura 3.3 se observa que *S. aureus* muestra una gran cantidad de micelio segmentado que produce esporas de superficie lisa, con algunos grumos de

una sustancia que pudiera estar produciendo; lo que le da una apariencia ligeramente irregular a algunas esporas, pero en su mayoría se observan lisas.

K-155 también produce esporas lisas en agar nutritivo, no obstante, al observar su micelio al microscopio electrónico (Figura 3.4), este es más alargado y con un número mayor de septos, a diferencia de las cadenas de *S. aureus*. El tamaño de las esporas es similar entre estas dos cepas, por lo tanto, la diferencia radica en la longitud de las cadenas de esporas.

Para el caso de *S. thermocarboxydus* (Figura 3.5), observamos esporas de mayor grosor y cubiertas en su mayoría por lo que suponemos es una sustancia que produce, la cual recubre la espora, y le da el aspecto rugoso. Las cadenas observadas son de un tamaño intermedio entre *S. aureus* y K-155. Sin embargo, el diámetro del micelio es la mayor diferencia entre esta cepa y las mencionadas anteriormente.

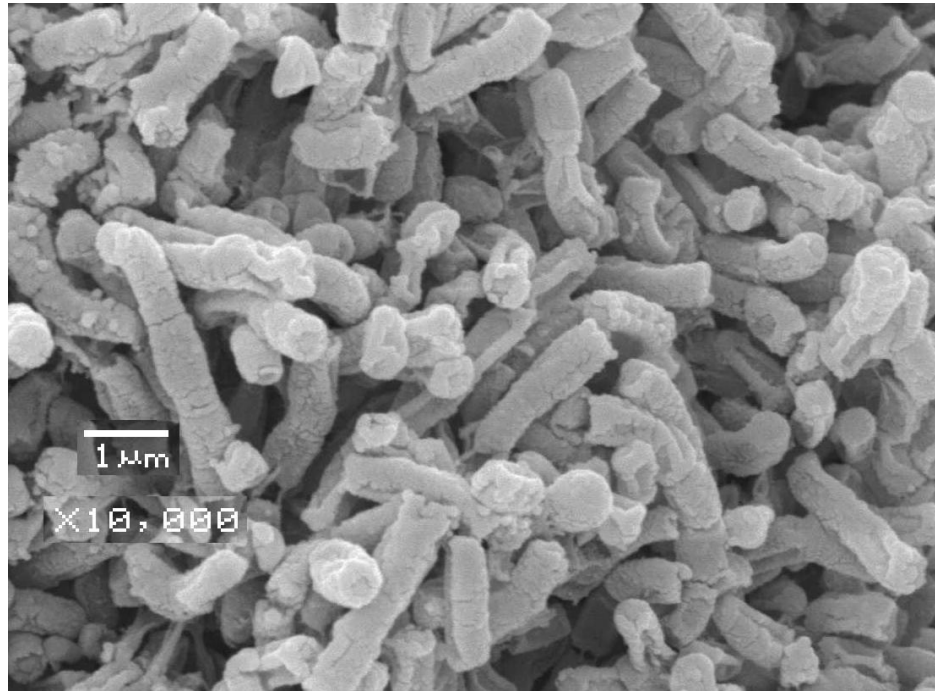


Figura 3.3 *S. aureus*. Micelio y esporas vistas al microscopio electrónico de barrido a 10 000X.

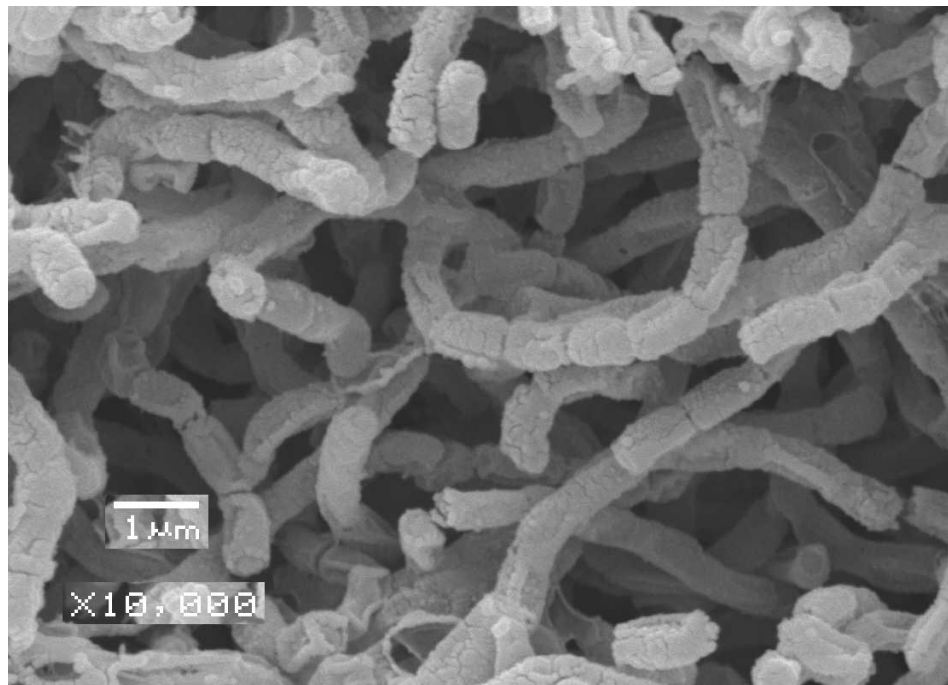


Figura 3.4 K-155. Micelio y esporas vistas al microscopio electrónico de barrido a 10 000X

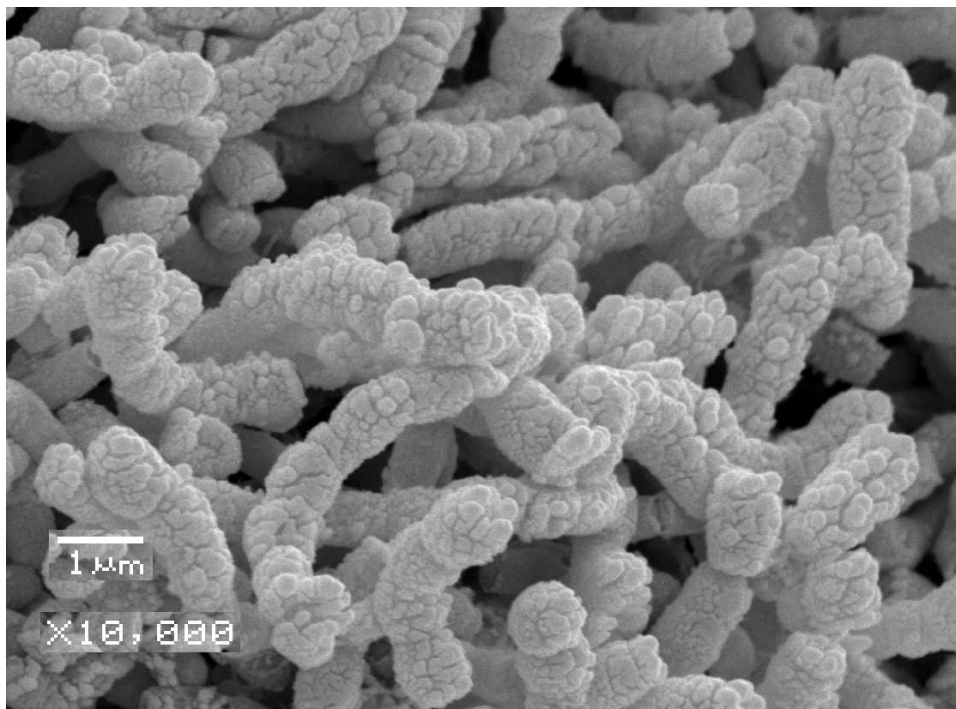


Figura 3.5 *S. thermocarboxydus*. Micelio y esporas vistas al microscopio electrónico de barrido a 10 000X

Dentro de las especies de *Streptomyces* reportadas en el Bergey's manual of determinative bacteriology, la mayoría producen esporas con una superficie lisa, siendo entonces este tipo de superficie la más común.

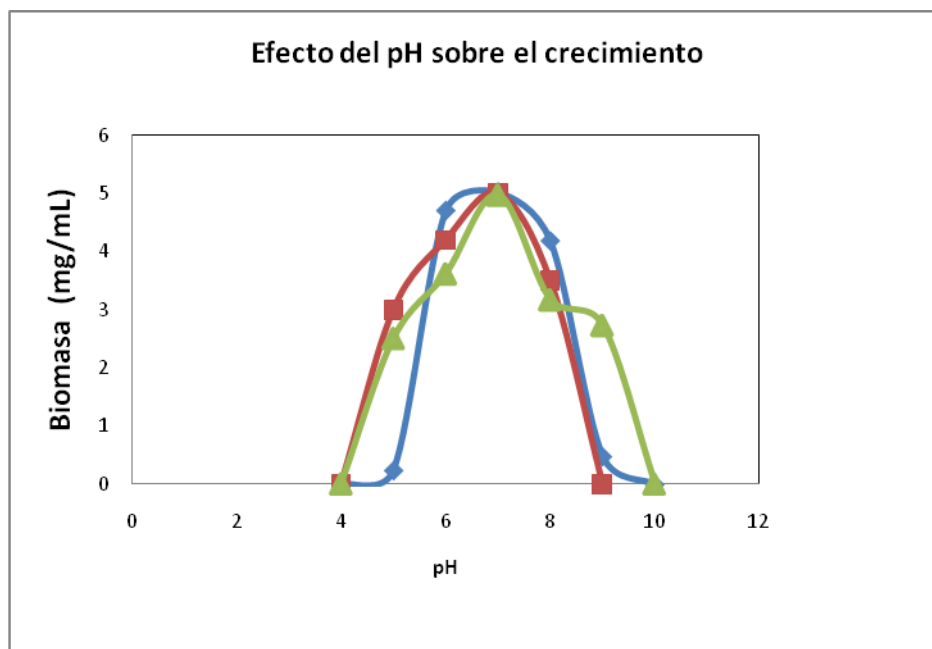
Con la descripción de esporas lisas no es posible diferenciar a K-155 de *S. aureus*, pero al observar el conjunto de características, es posible determinar diferencias entre estas dos cepas, principalmente en el número de esporas por cadena (segmentación). Entre K-155 y *S. thermocarboxydus* la diferencia es más notoria, ya que las esporas de esta última cepa son más gruesas y tienen una apariencia rugosa.

Análisis fisiológico

Efecto del pH sobre el crecimiento de Streptomyces

La mayoría de los actinomicetos son microorganismos que crecen bien a valores de pH cercanos a la neutralidad. K-155, así como las especies de referencia, muestran este comportamiento, ya que, como se observa en la gráfica 3.1, las 3 cepas muestran un mayor crecimiento a pH de 7 y su rango de crecimiento va de un pH de 5 a 9. En este experimento se observa una diferencia entre *S. aureus* y K-155, pues la primera presenta un buen crecimiento a pH = 5 mientras que K-155 no. El pH que permite el desarrollo de estas cepas coincide con la literatura, ya que el rango de pH óptimo para el crecimiento de *Streptomyces* esta reportado entre 6.8 y 8.0 [5].

Existen reportes de especies de *Streptomyces* neutrotolerantes acidofílicas, las cuales crecen en un rango de pH de 3.5 – 7, con un pH óptimo entre 5.0 y 5.5 [21]. También se han aislado especies de *Streptomyces* que crecen en ambientes alcalinos, por ejemplo, *Streptomyces sodiiphilus* que tiene un pH óptimo de crecimiento entre 9.0 y 10.0 [16].



Gráfica 3.1 Efecto del pH sobre el crecimiento de K-155 y otras especies de *Streptomyces*.

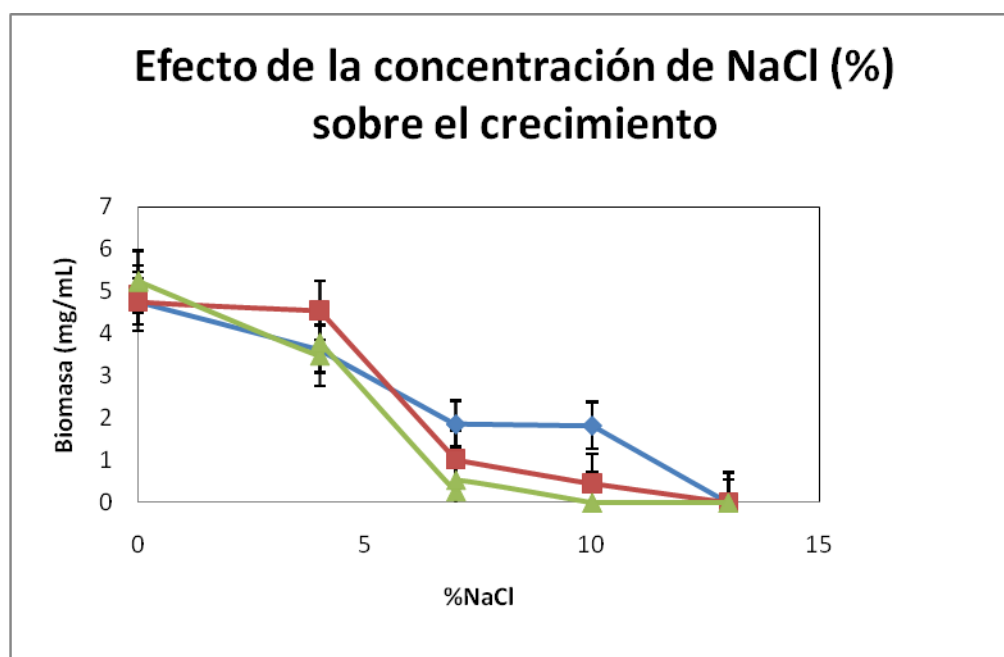
—▲— *S. thermocarboxydus* —◆— K-155 —■— *S. aureus*

Las 3 cepas analizadas son especies de *Streptomyces* aisladas de suelo, por lo que su comportamiento es similar. En ninguno de los casos se reportan suelos ácidos ni alcalinos, y quizá por ello, el rango de pH que permite su crecimiento es muy similar en las 3 cepas.

Efecto de la concentración de NaCl sobre el crecimiento de Streptomyces

Se evaluó la capacidad de las 3 cepas para crecer en ambientes con diferente concentración de NaCl. En este estudio se obtuvo una diferencia de K-155 con las especies de referencia, pues como se observa en la gráfica 3.2, esta cepa

es capaz de crecer en concentraciones de hasta 10% de NaCl , a diferencia de *S. aureus* y *S. thermocarboxydus* que soportan concentraciones de solo un 7%. Esto puede asociarse a que el suelo del cual se aisló a K-155 es un suelo salitroso, siendo esta la posible razón de que resista mayores concentraciones de sal en el medio.



Gráfica 3.2 Efecto de la concentración de NaCl sobre K-155 y otras especies de *Streptomyces*.

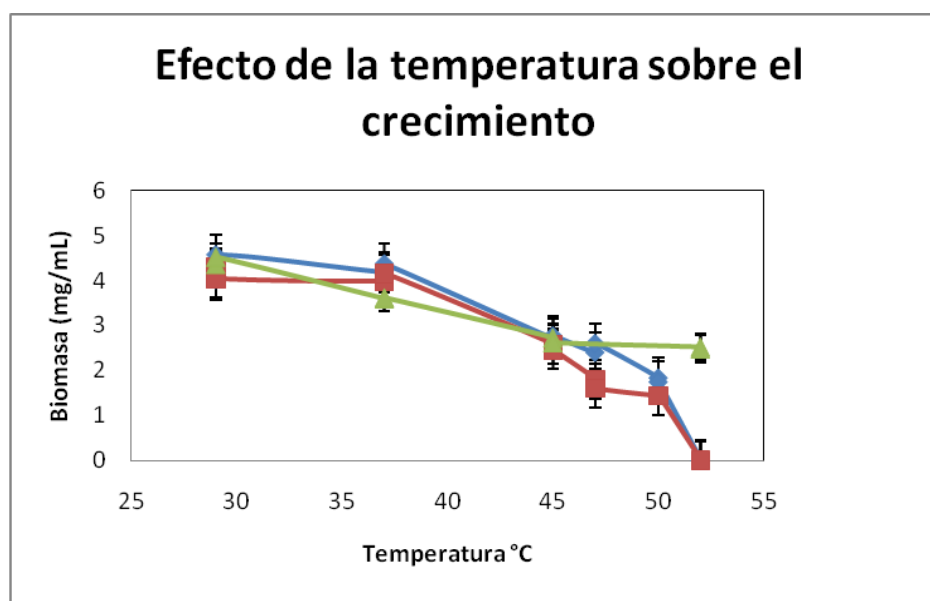
—▲— *S. thermocarboxydus* —◆— K-155 —■— *S. aureus*

Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de Streptomyces

Dentro del rango de temperaturas analizado, se encontró que las 3 cepas de *Streptomyces* tienen un mayor crecimiento a 29°C (Gráfica 3.3.). Así mismo, *S. aureus* y K-155 muestran una curva de crecimiento similar a diferentes

temperaturas, creciendo de manera adecuada entre 29 y 37°C pues a temperaturas mayores a 45°C su crecimiento decae considerablemente, mientras que *S. thermocarboxydus* crece en temperaturas de hasta 52°C y está reportado que es capaz de crecer hasta los 55°C. Con esta característica también podemos diferenciar a K-155 de *S. thermocarboxydus* pues si ambas se incuban a más de 50°C únicamente tendríamos crecimiento de ésta última.

La temperatura óptima de crecimiento de los *Streptomyces* se encuentra entre 25 y 35°C según el Bergey's manual of determinative bacteriology, sin embargo también existen especies de *Streptomyces* psicrófilas con temperaturas óptimas de crecimiento de 15°C y psicotróficas con crecimiento a temperaturas menores a 5°C [8]. Así como especies termófilas, por ejemplo, *Streptomyces thermoautotrophicus* cuya temperatura óptima de crecimiento es de 65°C.



Gráfica 3.3 Efecto de la temperatura de incubación sobre K-155 y otras especies de *Streptomyces*. ▲ *S. thermocarboxydus* ◆ K-155 ■ *S. aureus*

Análisis bioquímico

Degradación de fuentes de carbono complejas

Los *Streptomyces* en general son capaces de emplear diversas fuentes de carbono complejas. Esta propiedad se encontró en las 3 especies de *Streptomyces* (Tabla 3.4), sin embargo, resulta relevante reportarla debido a la actividad enzimática que deben tener estos microorganismos para poder degradarlas; en este caso actividad amilolítica, proteolítica y celulolítica. Esta actividad puede pensarse regular en este tipo de bacterias que son habitantes del suelo donde existe una amplia variedad de materia orgánica que puede ser empleada como fuente de carbono.

Propiedad	<i>K-155</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S. thermocarboxydus</i>
Degradación de almidón	++	++	++
Degradación de caseína	++	++	++
Degradación de celulosa	++	++	++

Tabla 3.4 Degradación de fuentes de carbono complejas por K-155 y otras especies de *Streptomyces*

Pruebas Bioquímicas

Las pruebas bioquímicas nos ayudan a determinar parte del metabolismo de los microorganismos y con ello encontrar algunas diferencias entre los mismos. En este caso se utilizó un sistema API 50CH, que contiene 50 carbohidratos

diferentes de configuración D y L. Con este experimento pudimos observar que existe una mayor similitud entre *S. aureus* y K-155 en cuanto al tipo y número de carbohidratos empleados como única fuente de carbono (Tabla 3.5), mientras que *S. thermocarboxydus* tiene la capacidad de degradar un mayor número de azúcares, lo cual lo distingue de las otras 2 especies de *Streptomyces*.

Según estos resultados, se puede pensar que *S. thermocarboxydus* tiene capacidad para emplear un mayor número de azúcares como única fuente de carbono.

En este trabajo, las pruebas bioquímicas fueron empleadas para determinar los carbohidratos que la cepa K-155 emplea como fuentes de carbono, con resultados que muestran diferencias reproducibles entre K-155 y las cepas de referencia empleadas.

Azúcar	K-155	<i>S. aureus</i>	<i>S. thermocarboxydus</i>
Galactosa	-	-	±
Fructosa	-	-	±
Ramnosa	±	±	+
Inositol	-	-	+
N-Acetilglucosamina	-	-	±
Maltosa	±	-	+
Trehalosa	±	±	-
Almidón	-	-	±
Glucógeno	±	±	+
Gentiobiosa	-	-	±
D-Arabitól	±	-	±

Tabla 3.5 Carbohidratos empleados por K-155 y otras especies de *Streptomyces*

En general, estas bacterias pueden degradar un gran número de carbohidratos, pero en la tabla únicamente se muestran aquellos en los que hubo diferencias entre las 3 cepas para su comparación.

Como observamos en la tabla 3.5, K-155 es capaz de degradar monosacáridos como la ramnosa, disacáridos como la maltosa y la trehalosa e incluso polisacáridos como el glucógeno. La gentiobiosa también es un disacárido, pero a diferencia de la maltosa y la trehalosa, posee un enlace β -1,6, mientras que la maltosa posee un enlace α -1,4 y en la trehalosa la unión se lleva a cabo entre los grupos OH del carbono anomérico de cada molécula de glucosa.

Otra característica que podemos observar es que *S. thermocarboxydus* degrada polioles como el inositol y el D-arabitól. K-155 también es capaz de degradar al

D-arabitol, pero no al inositol. La principal diferencia entre estos 2 compuestos es que el inositol es un poliol cíclico mientras que el D-arabitol es lineal.

Estos resultados también nos muestran diferencias en el metabolismo de las 3 cepas de *Streptomyces*. La capacidad para degradar las diversas fuentes de carbono puede deberse a distintos factores y entre ellos pueden encontrarse actividades enzimáticas que permiten el uso de estos carbohidratos como fuente de carbono. Sin embargo, para confirmar esto se deben hacer ensayos de actividad enzimática específicos para cada fuente de carbono.

Los resultados se tomaron como positivos cuando hubo producción de ácido a partir de la fuente de carbono probada. Este resultado se observó gracias al indicador rojo de fenol que posee un rango de pH de 6.4 a 8; en medio ligeramente básico es rojo y vira a amarillo en ambientes ácidos. Por ello, cuando el microorganismo, en este caso los estreptomicetos, emplean los carbohidratos como fuentes de carbono hay una acidificación del medio por la producción de ácidos orgánicos. En algunos casos el viraje no fue hacia amarillo, sino que se observó un color naranja por lo que se le asignó el símbolo ($\pm$) para designar un ligero cambio en el pH.

Análisis quimiotaxonómico

El análisis del hidrolizado ácido de la pared celular nos confirmó la presencia de ácido L-diaminopimélico en la pared celular de los *Streptomyces*. Este derivado

de aminoácido se encuentra en la pared celular de este género, a diferencia de otros actinomicetos que poseen otros componentes en su pared celular, como en el caso de *Nocardia* que también posee ácido diaminopimélico pero en su forma meso como se puede observar en la Figura 3.6.

Las manchas de los aminoácidos se observan en color morado y migran más rápido que las del ácido diaminopimélico de color verde oscuro cuya migración es más lenta, por lo que quedan por debajo de los aminoácidos. Como se puede observar el ácido diaminopimélico puede ser separado en sus dos componentes (meso y L), permitiendo así la identificación y clasificación de algunos géneros del orden de los actinomicetales. El ácido diaminopimélico es un componente principal de la pared celular de los *Streptomyces*, por lo cual se emplea en el análisis quimiotáxonómico, el cual, a su vez es usado para la identificación del género. La imagen nos muestra una gran cantidad de manchas moradas, lo que nos dice que la pared celular de los actinomicetos en general posee una gran cantidad de aminoácidos.

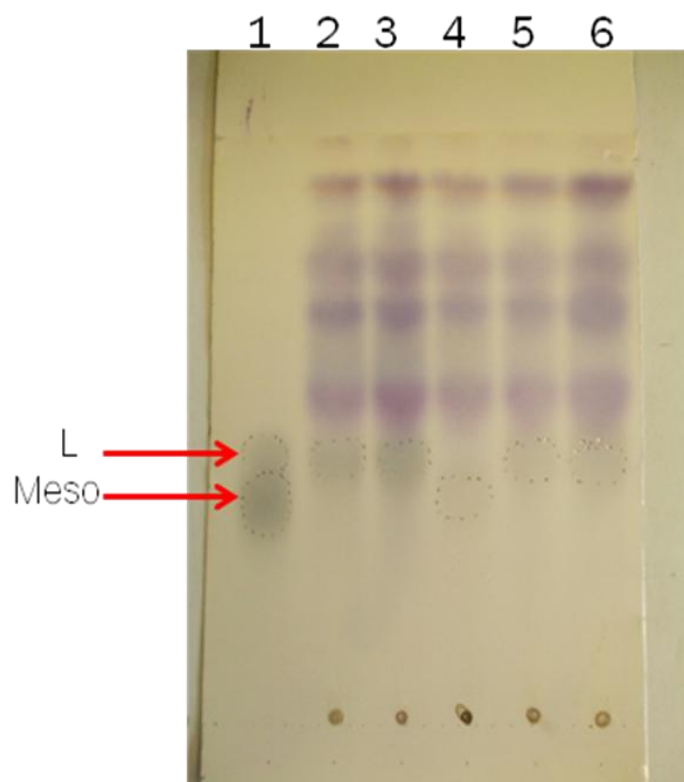


Figura 3.6 Análisis de la pared celular de *Streptomyces* K-155 y otros actinomicetos por medio de Cromatografía en Capa Fina. 1. Estándar Ácido Meso y L-Diaminopimérico, 2. Hidrolizado de K-155, 3. Hidrolizado de *S. aureus*, 4. Hidrolizado de *Nocardia brasiliensis*, 5. Hidrolizado de *S. thermocarboxydus*, 6. Hidrolizado de K-155.

Adicionalmente, se realizó la determinación de carbohidratos en la pared celular con la técnica descrita por Staneck and Roberts, 1974. Sin embargo, no se encontraron azúcares característicos.

Análisis genético

Extracción de DNA genómico de Streptomyces K-155

Con el método descrito en el diseño experimental, se obtuvo el DNA total de las células de *Streptomyces*. El producto obtenido es una solución transparente incolora y ligeramente viscosa. Este DNA se analizó mediante una electroforesis en gel de agarosa (Fig. 3.7), en la que se observó la integridad de dicho material genético, por eso aparecen en la parte superior del gel pues su peso molecular es elevado en comparación al marcador de peso molecular empleado (1 kb ladder Promega), figura 3.7.

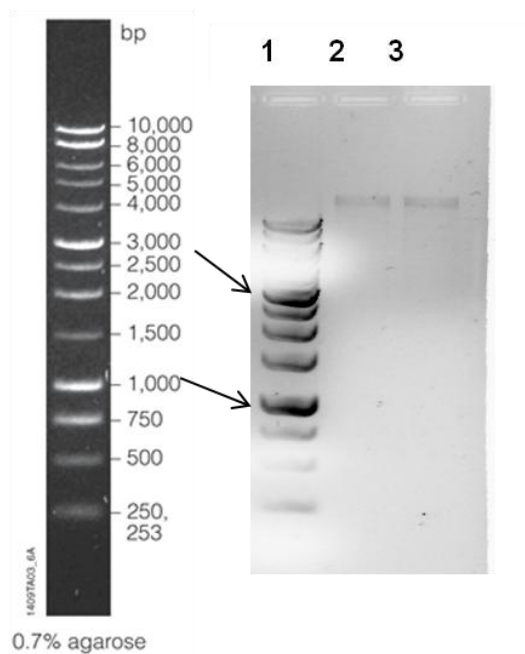


Figura 3.7 Izquierda: Marcador de peso molecular de 1 kb de Promega en 0.7% de agarosa. Derecha: 1. Marcador de peso molecular, 2. DNA genómico de *Streptomyces* dilución 1:5, 3. DNA genómico de *Streptomyces* dilución 1:10.

Amplificación y clonación de la secuencia de DNA que codifica para el RNA ribosomal 16S

El DNA obtenido se empleó como molde para amplificar el DNA ribosomal 16S mediante la técnica de PCR, con la cual se obtuvo el fragmento esperado de aproximadamente 1500 pb. Posteriormente, dicho fragmento se insertó en el plásmido pGEM-TEasy y se introdujo en células de *E. coli* DH5α. La construcción obtenida se aisló por medio de una minipreparación de plásmido (Fig. 3.8).

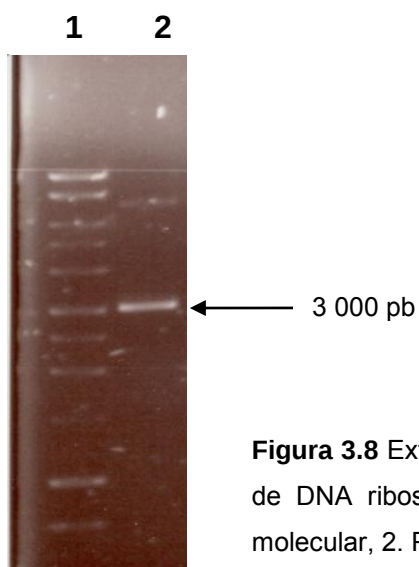


Figura 3.8 Extracción de la construcción del plásmido con la secuencia de DNA ribosomal 16S de células de *E.coli*. 1. Marcador de peso molecular, 2. Plásmido con la secuencia de DNA ribosomal insertada.

Como se observa en la figura 3.8, la banda de la construcción tiene un peso de aproximadamente 3 000 pb, sin embargo debido a los diferentes arreglos que puede tener un DNA plasmídico, el peso molecular puede variar. Esta variación puede resultar en la aparición de 2 o más bandas dentro del gel de electroforesis, como en este caso.

Para corroborar la construcción, se realizó la digestión con la enzima *Eco* RI y se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa, donde se observó la banda de 3000 pb correspondiente al plásmido y dos fragmentos, uno de aproximadamente 900 pb y otro de 600 pb que juntos suman los 1500 pb a los que corresponde la secuencia amplificada del DNA ribosomal 16S (Fig. 3.9). Esta construcción se envió a secuenciar y se obtuvo la secuencia que se presenta en la figura 3.10 donde se encontró una secuencia de corte para *Eco* RI (GAATTC) y con ello se confirmaron las 2 bandas que se obtuvieron después de realizar la digestión.

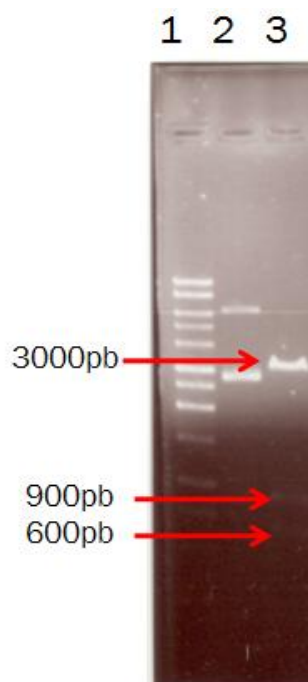


Figura 3.9 Digestión de la construcción del DNA ribosomal 16S de K-155 y pGEM - TEasy.
1. Marcador de peso molecular, 2. Construcción 3. Digestión de la construcción con *Eco* RI.

Análisis de la secuencia de DNA ribosomal 16S de la cepa K-155

Al obtener la secuencia de este DNA, se corroboró que se trata de una cepa del género *Streptomyces*, pues como se observa en la Figura 3.11, con ayuda de la base de datos del Ribosomal Database Project, el desplegado taxonómico se muestra hasta el género *Streptomyces*. Al desplegar el vínculo de las secuencias más cercanas (view selectable matches), encontramos que las especies que aparecen más cercanas a K-155 están reportadas como *Streptomyces thermocarboxydus*, *Streptomyces aureus* y varias cepas como *Streptomyces* sp. (Figura 3.12).

CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAAC
 ACATGCAAGTCGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACG
 TGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGA
 TCGCCTTGGGCATCCTTGGTGATCGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTAT
 CAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCG
 ACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCTGACTCCTGCGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
 TTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTT
 GTAAACCTCTTTTACGACAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTA
 ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCG
 TAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGTCGGTTGTAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTC
 TGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGT
 GAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGCGCCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGA
 CGCTGAGGAGCGAAAGCGTGAGGAGCGAACAGGATTAATACCCTGGTAGCCACGCGGAAA
 CGGTGGGCACTAGGTGTGGCGACATTCCACGTCTCGTGCCGCGAGCTAACGCATTAAGTG
 CCCC GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACA
 AGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATAC
 ACCGGAACCGTCCAGAGATGGGCGCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGT
 CGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTG
 TTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAG
 GAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAA
 TGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGT
 TCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCA
 TTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACATCGCCCGTCACGTACGAAAGTCGGT
 AACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGGAGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGACTG
 GCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCT
 TAAGCTTGGATCCCGGG

Figura 3.10 Secuencia de DNA que codifica para el RNA ribosomal 16S de la cepa K-155.

Secuencia α Secuencia β Secuencia γ Secuencia *Streptomyces* Sitio de corte para *Eco RI*

Con esta misma secuencia también se pudo hacer un análisis de 3 regiones que han sido identificadas dentro de un buen número de especies de *Streptomyces* [37]. Estas regiones fueron denominadas como α en los nucleótidos 982-998, β en los nucleótidos 1102-1122 y γ , una secuencia de aproximadamente 30 nucleótidos entre las posiciones 150 y 200, según la nomenclatura de *Streptomyces ambofaciens*.

Alfa y Beta son regiones que presentan diversos grados de variación, con los cuales se lograron establecer 19 patrones que se denominaron como $\alpha 1$ hasta $\alpha 19$. De la región beta se encontraron únicamente 12 variaciones. En el estudio se encontraron 33 combinaciones de α con β . De esta manera se analizó la secuencia de rDNA 16S de K-155 y se encontró una similitud del 100% con la combinación $\alpha 15/\beta 6$.

Dentro de este mismo estudio [37], esta combinación no fue muy común pues solo se encontraron 2 especies con la misma combinación de región α/β . No obstante, cabe destacar que estas especies no aparecen dentro de las más cercanas a K-155.

S. aureus y *S. thermocarboxydus* también fueron analizados de la misma manera. Para *S. aureus* se encontró la combinación $\alpha 4/\beta 2$ y para *S. thermocarboxydus* la combinación $\alpha 15/\beta 6$. Por lo tanto, con este análisis encontramos similitud con *S. thermocarboxydus*, pero no con *S. aureus* en cuanto a las regiones α y β del DNA ribosomal 16S.

La región gamma resulta ser altamente variable cuando se comparan especies pertenecientes a diferentes grupos respecto a su región α/β , sin embargo, en este caso esta región no resulta muy útil pues las especies cercanas a K-155 poseen un elevado porcentaje de similitud, por lo que es muy probable que posean una región gamma muy parecida o idéntica.

Por último, la región coloreada de rosa (Fig. 3.10) es una secuencia encontrada únicamente en estreptomicetos y en miembros del orden de *Planctomycetales*, pero no en los catálogos de rRNA de otros *Actinomicetales*.

The screenshot displays the RDP SeqMatch web interface. The browser address bar shows the URL: `http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_sum.jsp?vector=204&depth=0¤tRoot=0&num=20`. The page title is "RIBOSOMAL DATABASE PROJECT". The main navigation bar includes links: BROWERS | CLASSIFIER | LIBCOMPARE | SEQMATCH | PROBE MATCH | TREE BUILDER | PYRO | TAXOMATIC | SEQCART | ASSIGNGEN.

The "SeqMatch :: Summary" section is active, with links for [new match](#), [summary](#), and [detail](#). Below this, there are buttons for "Select All Match Hits to seqCART" and a "Display depth: Auto" dropdown. A message states: "Lineage (click node to return it to hierarchy view):".

The "Hierarchy View:" section shows a taxonomic tree:

- no rank Root (1) (query sequences)
- domain Bacteria (1)
- phylum Actinobacteria (1)
- class Actinobacteria (1)
- subclass Actinobacteridae (1)
- order Actinomycetales (1)
- suborder Streptomycineae (1)
- family Streptomycetaceae (1)
- genus Streptomyces (1)
- unknown [view selectable matches]

Buttons for "show printer friendly results" and "download as text file" are located to the right of the hierarchy. The "Data Set Options:" section is at the bottom. The status bar at the bottom indicates "Internet | Modo protegido: activado".

Figura 3.11 Análisis de la secuencia de DNA ribosomal 16S de K-155 empleando la base de datos del Ribosomal Database Project.

85

Al observar la figura 3.12, vemos que, a pesar de la similitud entre K-155 con *S. aureus* y *S. thermocarboxydus*, no se tiene un 100% de identidad. Este mismo resultado se obtuvo al hacer una comparación empleando la base de datos del NCBI, donde se encontró una similitud del 98% con *S. aureus* y *S. thermocarboxydus*.

El 98% es un alto porcentaje de similitud, sin embargo, al analizar el conjunto de características, se observan diferencias, las cuales muestran que la secuencia de DNA ribosomal no es suficiente para poder asignarle una especie a un microorganismo; por lo que los resultados obtenidos son complementarios e indican que K-155 no pertenece a alguna de las especies de referencia.

Actividad biológica de la cepa K-155

La cepa K-155 fue analizada en búsqueda de actividad antibiótica, no obstante, se encontró que no solo inhibe a bacterias Gram-positivas como *Bacillus subtilis* y *Micrococcus luteus* sino que su mayor efecto inhibitorio se encontró contra levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans* (Tabla 3.6 y Fig 3.13). El efecto observado contra *M. luteus* llamó la atención debido a que en la periferia del crecimiento de *Streptomyces* la cepa de prueba fue capaz de crecer, sin embargo, desconocemos la razón de este tipo de crecimiento. La prueba se realizó de manera cualitativa, ya que se desconoce el tipo de metabolito producido.

Microorganismo de prueba	Grado de Inhibición		
	K-155	<i>S. aureus</i>	<i>S. thermocarboxydus</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	++	++	++
<i>Micrococcus luteus</i>	++	++	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	++++	++++	++++
<i>Candida albicans</i>	++++	++++	++++

Tabla 3.6 Efecto antibiótico de K-155 sobre las cepas de prueba

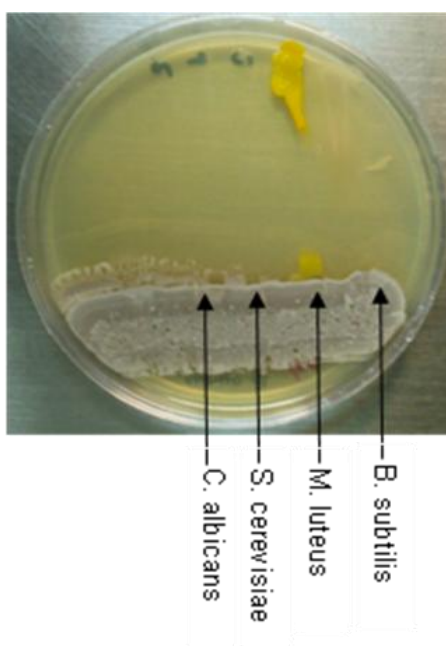


Figura 3.13 Inhibición del crecimiento de los microorganismos de prueba por *S. aureus*

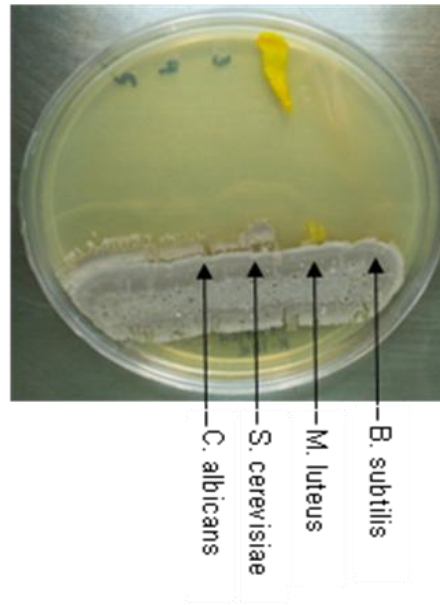


Figura 3.14 Inhibición del crecimiento de los microorganismos de prueba por K-155

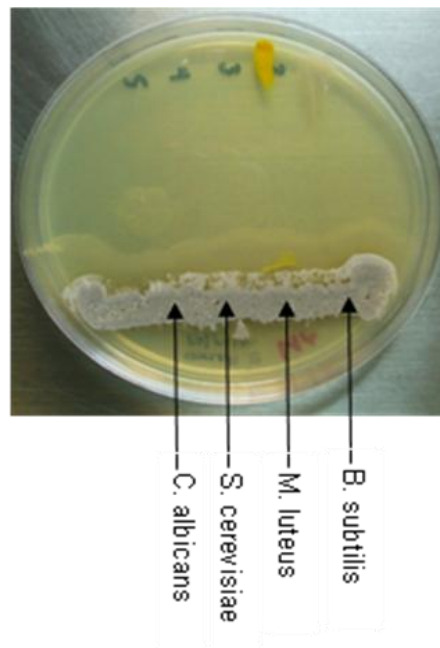


Figura 3.15 Inhibición del crecimiento de los microorganismos de prueba por *S. thermocarboxydus*.

S. aureus y *S. thermocarboxydus* presentaron un patrón similar de inhibición (Tabla 3.6, Fig. 3.14 y 3.15), pues también inhibieron el crecimiento de las levaduras, y en menor grado el crecimiento de *Bacillus subtilis* y *Micrococcus luteus*. Debido a que la prueba es cualitativa, no es posible determinar si realmente el efecto inhibitorio de una cepa sobre algún microorganismo de prueba sea diferente al de la otra. A pesar de que la inoculación se hizo de la misma manera y al mismo tiempo, la cantidad de cada microorganismo de prueba depositada en el agar pudo variar en cada muestra tomada con el asa bacteriológica.

El efecto antibiótico es similar entre las 3 cepas de *Streptomyces*, sin embargo en un estudio previo realizado en el 2003 por Manfio *et al.*, se reporta que *S. aureus* no presentó actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* ni *Candida albicans*. Esta diferencia pudiera deberse al método empleado en la evaluación de la actividad antibiótica, ya que la producción de los metabolitos secundarios depende de factores como el tiempo de incubación, el medio de cultivo empleado y la temperatura entre otros.

IV. CONCLUSIONES

- ✓ El estudio de la cepa K-155 mostró que los mejores medios para el crecimiento del microorganismo son YMG, Almidón-Sales inorgánicas y MS. En cuanto a desarrollo y coloración del micelio aéreo, producción de pigmentos solubles, así como a superficie de esporas, se observaron diferencias entre K-155, *S. aureus* y *S. thermocarboxydus*.
- ✓ K-155 resultó más tolerante al NaCl que *S. aureus* y *S. thermocarboxydus*.
- ✓ La cepa K-155 crece en condiciones de pH neutro y es una especie mesófila ya que su mejor crecimiento se obtiene a temperaturas entre 29-37°C. Por su parte, *S. thermocarboxydus* es una especie termófila.
- ✓ Referente al empleo de carbohidratos como fuente de carbono, las principales diferencias entre K-155 y *S. aureus* es el uso de D-arabitol y maltosa: la primera es capaz de usarlas mientras que la segunda no. Entre *S. thermocarboxydus* y K-155, las principales diferencias se observan en el uso de galactosa, fructosa, inositol y *N*-acetilglucosamina, ya que K-155 no es capaz de degradarlas.
- ✓ Se confirmó la pertenencia de la cepa K-155 al género *Streptomyces* gracias a las características morfológicas y a la presencia de ácido L-diaminopimélico en su pared celular.
- ✓ La secuencia completa de DNA ribosomal 16S de K-155 posee similitudes con las cepas de referencia,, sin embargo al analizar todos los resultados en conjunto, existen evidencias suficientes para pensar que K-155 corresponde a una nueva especie del género *Streptomyces*.

- ✓ La actividad contra levaduras presentada por K-155 representa una característica importante debido a que puede estudiarse su producción y esta puede resultar de interés industrial, al igual que su actividad celulolítica, amilolítica y proteolítica.

Esta misma actividad antimicrobiana es útil para diferenciar a K-155 de *S.aureus*, ya que en el estudio realizado en la descripción de ésta última cepa, se reporta que no posee actividad ni contra *B. subtilis* ni *Candida albicans*.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] **Abbas I.H.** 2006. A biological and biochemical studies of Actinomycetes Isolated from Kuwuait Saline Soil-Kuwait. *J Appl Sci Res.* **2**: 809-815.
- [2] **Al-Tai A., Kim B., Kim S.B., Manfio G.P., Goodfellow M.** 1999. *Streptomyces malaysiensis* sp .nov., a new streptomycete species with rugose, ornamented spores. *Int J Sys Bacteriol.* **49**: 1395-1402.
- [3] **Anderson A.S., Wellington E.M.H.** 2001. The Taxonomy of *Streptomyces* and related genera, *Int J Syst Evol Microbiol*, **51**: 797-814.
- [4] **Becker B., Lechevalier M.P., Gordon R.E., Lechevalier H.A.** 1964. Rapid differentiation Between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Appl Microbiol.* **12**: 421-423.
- [5] **Bergeys Manual of Determinative Bacteriology** 9th Edition, 1994, p 668, 2451-2492. Edited by John G. Holt
- [6] **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** 2nd Edition, 2001, vol. 1, p. 43-109. Ed Springer.
- [7] **Cárdenas Catalina.** (2009). Evaluación del uso biotecnológico de la semilla de *Ditaxis heterantha* para la producción de Safranál. Tesis de maestría- Facultad de Química, UNAM.
- [8] **Chipeva V., Christova K., Chipev N., Moncheva P.** 1996. Extracellular enzyme activity of *Streptomyces* strains isolated from soils on the Livingston Island, *Antartic. Bulgarian Antartic Research, Life Sciences* 24-30.

- [9] **Cole J.R., Chai B., Farris R.J., Wang Q., Kulam-Syed-Mohideen A.S., McGarrell D.M., Bandela A.M., Cardenas E., Garrity G.M., Tiedje J.M.** 2007. The ribosomal database project (RDP-II): introducing *myRDP* space and quality controlled public data. *Nucl Acid Res.* **35**: D169-D172.
- [10] **Cummins C.S., Harris H.** 1958. Studies on the Cell-wall composition and taxonomy of Actinomycetales and related Groups. *J Gen Microbiol.* **18**: 173-189.
- [11] **Dastager S.G., Kim C.J., Lee J.C., Agasar D., Park J.D., Li, W.J.** 2008. *Streptomyces deccanensis* sp. nov., an alkaliphilic species isolated from soil. *Int J Sys Evol Microbiol.* **58**: 1089-1093.
- [12] **Demain A.L. & Sánchez S.** 2009. Microbial Drug Discovery. *J. Antibiot.* **62**: 5-16.
- [13] **García M.D., Uruburu F.** Conservación de Cepas Microbianas. Colección española de cultivos Tipo (CECT). Universitat de València.
- [14] **Gadkari D., Schricker K., Acker G., Kroppenstedt R.M., Meyer O.** 1990. *Streptomyces thermoautotrophicus* sp. nov., a thermophilic CO- and H₂-oxidizing Obligate Chemolithoautotroph. *Appl Environ Microbiol.* **56**: 3727-3734.
- [15] **Jung-Hoon Yoon, Yong-Ha Park.** 2000 Phylogenetic analysis of the genus *Thermoactinomyces* based on 16S rDNA sequences. *Int J Sys Evol Microbiol.* **50**: 1081-1086.
- [16] **Jun W., Zhang Y.G., Zhang Y.Q., Tang S.K., Xu P., Xu L.H., Jiang C.L.** 2005. *Streptomyces sodiiphilus* sp., a novel alkaliphilic actinomycete. *Int J Sys Evol Microbiol.* **55**: 1329-1333.
- [17] **Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F., Hopwood D.A.** 2000. Practical *Streptomyces* Genetics I. The John Innes Foundation p. 161-171.

- [18] **Kim B.S., Falconer C., Williams E., Goodfellow M.** 1998. *Streptomyces thermocarboxydovorans* sp. nov. and *Streptomyces thermocarboxydus* sp. nov., two moderately thermophilic carboxydotrophic species from soil. *Int J Sys Bacteriol* **48**: 59-68.
- [19] **Kim B.S., Goodfellow M.**, 2002. *Streptomyces avermitilis* sp. Nov., nom. Rev., a taxonomic home for the avermectin-producing streptomycetes. *Int J Sys Evol Microbiol.* **52**: 20011-2014.
- [20] **Kim S.B., Goodfellow M.** 2002. *Streptomyces thermospinisporus* sp. nov., a moderately thermophilic carboxydotrphic streptomycete isolated from soil. *Int J Sys Evol Microbiol.* **52**: 1225-1228.
- [21] **Kim S.B., Seong N., Jeon S.J., Bae K.S., Goodfellow M.** 2004. Taxonomic study of neutrotolerant acidophilic actinomycetes isolated from soil and description of *Streptomyces yeochonensis* sp. nov. *Int J Sys Evol Microbiol.* **54**: 211-214.
- [22] **Kim H.J., Lee S.C., Hwang B.K.** 2006. *Streptomyces cheonanensis* sp. nov., a novel streptomycete with antifungal activity. *Int J Sys Evol Microbiol.* **56**: 471-475.
- [23] **Lechevalier M.P., Lechevalier H.** 1970. Chemical Composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int J Sys Bacteriol.* **20**: 435-443.
- [24] **Liras P., Martín J.F.** 2005. Assay Methods for Detection and Quantification of Antimicrobial Metabolites Produced by *Streptomyces clavuligerus*, *Methods in Biotechnology, Vol. 18: Microbial Processes and Products* Edited by: J. L. Barredo Humana Press Inc., Totowa, NJ. p.149-163.

- [25] **Maidak B.L., Cole J.R., Lilburn T.G., Parker Jr Ch.T., Saxman P.R., Farris R.J., Garrity G.M., Olsen J.G., Schmidt T.M., Tiedje J.M.** 2001. The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nuc Acid Res.* **29**: 173-174.
- [26] **Manfio G.P., Atalan E., Zakrzewska-Czerwinska J., Mordarski M., Rodríguez C., Collins M.D., Goodfellow M.** 2003. Classification of novel soil streptomycetes as *Streptomyces aureus* sp. nov., *Streptomyces laceyi* sp. nov. and *Streptomyces sanglieri* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek* **83**: 245-255.
- [27] **Nocardia and Streptomyces:** Proceedings of the international Symposium on *Nocardia* and *Streptomyces* October 4-8, 1976 Wasaw/ed. By Marian Mordarski, Włodzimierz Kurylowicz, Janusz Jeljaszewicz. Fischer Verlag. P. 3-25, 119-124, 137-144, 399-408.
- [28] **Pathom-aree W., Nogi Y., Sutcliffe I.C., Ward A.C., Horikoshi K., Bull A.T., Goodfellow M.** 2006. *Dermacoccus abyssi* sp. nov., a piezotolerant actinomycete isolated from the Mariana Trench. *Int J Sys Evol Microbiol.* **56**: 1233-1237.
- [29] **Pernodet J.L., Boccard F., Alegre M.T., Gagnat J., Guérineau M.** 1989. Organization and nucleotide sequence analysis of a ribosomal RNA gene cluster from *Streptomyces ambofaciens*. *Gene* **79**: 33-46.
- [30] **Petrosyan P., García-Varela M., Luz-Madrigal A., Huitrón C., Flores M.E.** 2003. *Streptomyces mexicanus* sp. nov., a xylanolytic micro-organism isolated from soil. *Int J Sys Evol Microbiol.* **53**: 269-273.
- [31] **Prokofeva M.I., Miroshnichenko M.L., Kostrinka N.A., Chernyh N.A., Kuznetsov B.B., Tourova T.P., Bonch-Osmolovskaya E.A.** 2000. *Acidilobus aceticus* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic thermoacidophilic archaeon from continental hot vents in Kamchatka. *Int J Sys Evol Microbiol.* **50**: 2001-2008.

- [32] **Quintana E.T., Trujillo M.E., Goodfellow M.** 2003. *Actinomadura Mexicana* sp. nov. and *Actinomadura meyerii* sp. nov., two novel soil Sporactinomycetes. *Sys Appl Microbiol.* **26**: 511-517.
- [33] **Rodicio MR, Mendoza MC.** 2004 Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **22**: 238-45.
- [34] **Schleifer H.K., Kandler O.** 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev.* **36**: 407-477.
- [35] **Shirling E.B., Gottlieb D.** 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Sys Bacteriol.* **16**: 313-340.
- [36] **Stackebrandt E., Rainey F.A., Ward-Rainey N.L.** 1997. Proposal for a New Hierarchic Classification System, Actinobacteria classis nov. *Int J Sys Bacteriol.* **47**:479-491.
- [37] **Stackebrandt E., Witt D., Kemmerling C., Kroppenstedt R., Liesack W.** 1991. Designation of Streptomycete 16S and 23S rRNA-based target regions for Oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol.* **57**: 1468-1477.
- [38] **Staneck J.L., Roberts G.D.** 1974. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl Microbiol* **28**: 226–231.
- [39] **Sun W., Huang Y., Zhang Y.Q., Liu Z.H.** 2007. *Streptomyces emeiensis* sp. Nov., a novel streptomycete from soil in China. *Int J Sys Evol Microbiol.* **57**: 1635-1639.
- [40] **Touchstone J.C., Dobbins M.F.** Practice of Thin Layer Chromatography. 1983. 2nd edition. p. 22-42. Ed, John Wiley and Sons.

- [41] **Tresner H.D., Hayes J.A., Backus E.J.** 1968. Differential Tolerance of Streptomycetes to Sodium Chloride as a taxonomic aid. *Appl Microbiol.* **16**: 1134-1136.
- [42] **Ueda K., Seki T., Kudo T., Yoshida T., Kataoka M.** 1999 Two distinct Mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. *J Bacteriol.* **181**: 78-82.
- [43] **Vandamme B. P., Pot P., Gillis M., De Vos P., Kersters K., Swings J.** 1996 Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. *Microbiol Rev.* **60**: 407-438.
- [44] **Weisburg W.G., Barns S.M, Pelletier D.A., Lane D.J.** 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study, *J. Bacteriol.* **173**(2): 697-703.
- [45] **Xiao J., Wang Y., Luo Y., Xie S.J., Ruan J.S., Xu J.** 2009. *Streptomyces avicenniae* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the rhizosphere of the mangrove plant *Avicennia mariana*. *Int J Sys Evol Microbiol.* **59**: 2624-2628.
- [46] **Xu P., Li W.J., Wu W.L., Wang D., Xu L.H., Jiang C.L.** 2004. *Streptomyces hebeiensis* sp. nov. *Int J Sys Evol Microbiol.* **54**: 727-731.
- [47] **Yamaguchi T.** 1965. Comparison of the cell-wall composition of morphologically distinct Actinomycetes. *J Bacteriol.* **89**: 444-453.

Páginas web consultadas:

- [48] **UAM. Laboratorio de Microbiología.**
www.azc.uam.mx/cbi/quimica/microbiologia/micro.html Fecha de consulta: 4 ene 2010.

- [49] **Anexo I. Conteo en Cámara de Neubauer.**
<bdigital.eafit.edu.co/bdigital/PROYECTO/P660.../anexos.pdf> Fecha de consulta: 17 mar 2009.
- [50] **Hipertextos del área de Biología**
<http://www.biologia.edu.ar/bacterias/micro9.htm> Fecha de consulta: 12 nov 2009.
- [51] **Microbiología del suelo.**
<http://bc.inter.edu/facultad/yserrano/microsuelo.htm> Fecha de consulta: 10 nov 2009.
- [52] **National Center for Biotechnology Information. GeneBank.**
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> Fecha de consulta: 7 Dic 2009.
- [53] **Ribosomal Database Project. Sequence Match.**
<http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp> Fecha de consulta: 7 Dic 2009.
- [54] **University of Miami. Department of Biology. Cell and Molecular Biology.**
<http://www.bio.miami.edu/~cmallery/255/255hist/mcb4.24.rRNA.jpg>
Fecha de consulta: 25 Nov 2009.
- [55] **The International Comittee on Systematics of Prokaryotes.**
<http://www.the-icsp.org/> Fecha de consulta 15 Ene 2010.

ANEXOS

ANEXO I

Medios de cultivo empleados

Para Caracterización Morfológica

ISP-1 Caldo Extracto de Triptona-Levadura

Sustancia	Cantidad
Triptona	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Agua destilada	1.0 L

Ajustar a pH 7.2 y esterilizar en autoclave 20 min 121 lb presión.

ISP-2 YMG (Yeast Extract, Malt Extract, Glucose)

Sustancia	Cantidad
Extracto de levadura	4.0 g
Extracto de malta	10.0 g
Glucosa	4.0 g
Agua Destilada	1.0 L
Ajustar a pH 7.2 y esterilizar en autoclave	

ISP-3 Agar Avena

Sustancia	Cantidad
Avena	20.0 g
Agar	18.0 g

Cocer 20.0 g de avena en un litro de agua por 20 min. Filtrar a través de gasa. Aforar a 1 L para restaurar el volumen. Añadir 1.0 mL de solución de sales traza. Ajustar a pH 7.2 con NaOH. Agregar el agar y esterilizar en autoclave.

Solución de sales traza:

Sustancia	Cantidad
FeSO ₄	0.1 g
MnCl ₂	0.1 g
ZnSO ₄	0.1 g
H ₂ O destilada	100.0 mL

ISP-4 Almidón-Sales inorgánicas

Solución I: pesar 10.0 g de almidón soluble y mezclar con un poco de agua destilada para disolverlo. Llevar a 500 mL.

Solución II:

Sustancia	Cantidad
K ₂ HPO ₄	1.0 g
MgSO ₄	1.0 g
NaCl	1.0 g
(NH ₄)SO ₄	2.0 g
CaCO ₃	2.0 g
H ₂ O destilada	500 mL
Solución de sales traza	1.0 mL
Ajustar a pH entre 7.0-7.4	

Mezclar la Solución I y Solución II. Añadir Agar y esterilizar en autoclave.

ISP-5 Agar Glicerol-Asparagina

Sustancia	Cantidad
L-asparagina	1.0 g
Glicerol	10.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
H ₂ O destilada	1.0 L
Solución de sales traza	1.0 mL

Ajustar a pH de 7.0-7.4. Añadir agar y esterilizar en autoclave

Medio Agar MS

Sustancia	Cantidad
Manitol	20 g
Harina de soya	20 g
Agar	20 g
H ₂ O	1.0 L
Se esteriliza en autoclave 2 veces.	

Medio TSB

Sustancia	Cantidad
Digerido pancreático de caseína	17.0 g
Digestión enzimática de harina de soya	3.0 g
Dextrosa	2.5 g
Cloruro de Sodio	5.0 g
Fosfato dipotásico	2.5 g
H ₂ O destilada	1.0 L
El pH final es de 7.2. Se esteriliza en autoclave	

Para Análisis Bioquímico**Medio Basal Salino (MBS)**

Sustancia	Cantidad
Extracto de Levadura	0.5 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
CaCl ₂	0.2 g
NH ₄ Cl	1.0 g
Na ₂ HPO ₄	0.1 g
MgSO ₄	0.2 g
H ₂ O destilada	1 L

Se esteriliza en autoclave

API 50 CHB/E Medium

Sustancia	Cantidad
Sulfato amónico	2 g
Extracto de levadura	0.5 g
Triptona	1 g
Fosfato disódico	3.22 g
Fosfato monopotásico	0.12 g
Solución de oligoelementos	10 mL
Rojo de fenol	0.17 g
Agua desmineralizada	1 L

pH 7.4-7.8

ANEXO II

Medios y Soluciones empleadas en Análisis Genético

BUFFER P

Sustancia	Cantidad
Sacarosa	103 g
K ₂ SO ₄	0.25 g
MgCl ₂	2.02 g
Elementos traza	2 mL
H ₂ O destilada	llevar a 800 mL

Se distribuye en alícuotas de 80 mL y se esteriliza.

Justo antes de usar se añaden por cada 100 mL de la solución anterior:

1 mL de KH₂PO₄ 0.5%

10 mL CaCl₂ 3.68%

10 mL de Amortiguador TES pH 7.2 5.73%

Solución TE:

Tris 10 mM

EDTA 1 mM

Medio LB (Luria Bertani)

Sustancia	Cantidad
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O destilada	1 L
Se esteriliza en autoclave.	

Para la clonación se emplearon placas de agar LB con ampicilina (150 µg/mL)
IPTG y X-gal

SOLUCIÓN I

Glucosa 50 mM

Tris-HCl 25 mM

EDTA 10 mM

SOLUCIÓN II

NaOH 0.2 N

SDS 1%

SOLUCIÓN III

60 mL de Acetato de potasio 5 M

11.5 mL de Acido acético Glacial

28.5 mL de agua Destilada