



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN- SISAL

Evaluación de la actividad biológica de actinobacterias aisladas del Golfo de México

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
IRMA IVETTE ALATRISTE RIVERA

Director de Tesis:
Dra. María Leticia Arena Ortiz
UMDI-SISAL

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. diciembre 2016



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.

Resumen

Las actinobacterias son bacterias muy abundantes en el suelo y ambientes marinos, son microorganismos filamentosos, gram positivos, no móviles, son generalmente saprófitos y se han descrito tanto en ambientes naturales como modificados por el hombre, los principales géneros de actinobacterias, aislados a partir de suelos son *Micromonospora*, *Nocardia* y *Streptomyces*. En esta investigación se planteó caracterizar fenotípicamente actinomicetos aislados de sedimentos marinos del Golfo de México para ello, se determinó la selectividad de los aislados en diferentes medios de cultivo; cualitativamente se registró si la producción de pigmentos carotenoides se ve afectada por la presencia de luz y oscuridad; se identificó la aproximación filogenética de los aislados; se determinó el isómero del ácido diaminopimélico en los aislados; también se evaluó si los pigmentos carotenoides corresponden a la presencia de ácidos micólicos y finalmente se evaluó el crecimiento de los aislados en distintos compuestos como única fuente de carbono y nitrógeno.

Los 25 aislados recuperados, presentaron características de coloración naranja y amarilla, de superficie lisa y consistencia suave-mantecosa (butirosa), se sabe que esta consistencia generalmente se observa en los géneros *Dietzia*, *Rhodococcus*, *Gordonia* y *Tsukamurella*.; se comprobó que los aislados presentaron mejor crecimiento en medios de cultivo selectivos para actinomicetos; según el isómero del DAP se confirmó que ninguno de los aislados pertenece al género *Streptomyces*, también se encontró que los microorganismos a los que se les extrajeron ácidos micólicos los contenían. Se seleccionaron 5 cepas tipo y se evaluó su crecimiento en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, se observó que el crecimiento y pigmentación, estuvo afectado por aquellas fuentes cuya estructura química fue más compleja, esto seguramente debido al alto costo energético para su síntesis. El análisis filogenético de las 5 cepas tipo, que se utilizaron basados en el gen 16S rARN, confirmaron que tres (I001, I006 e I013) pertenecen especies de los géneros *Dietzia* y *Rhodococcus*, mientras que I002 e I025 pertenecen al género *Erythrobacter*.

Este estudio pone en evidencia que para caracterizar cualquier microorganismo es importante no sólo hacer caso de pruebas tradicionales, es necesario hacer uso de técnicas moleculares para tener mayor exactitud y reproducibilidad en los datos reportados de cualquier investigación.

Índice

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ACTINOBACTERIAS AISLADAS DEL GOLFO DE MÉXICO

Resumen	1
Introducción	3
Antecedentes	4
Familia <i>Corynebacteriaceae</i>	7
Familia <i>Micromonosporaceae</i>	7
Familia <i>Streptomycetaceae</i>	8
Objetivos	9
General:	9
Específicos:	9
Hipótesis	10
Métodos y materiales	11
Extracción de ADN	13
Electroforesis horizontal	14
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	14
PCR del gen ribosomal 16S	15
Determinación de los isómeros del ácido diaminopimélico	16
Extracción de ácidos micólicos	18
Fuentes de carbono y nitrógeno	19
Resultados y Discusión	20
Extracción de ADN	23
Determinación del isómero del ácido diaminopimélico (DAP)	25
Determinación ácidos micólicos (MAC)	26
Fuentes de carbono	29
Fuentes de nitrógeno	34
Filogenia	42
Conclusiones	47
Perspectivas	48
Literatura	49
Anexos	65
Resiembra de UFC	65
Medios de cultivo	66
Electroforesis horizontal	67

Introducción

Dentro de la diversidad de microorganismos presentes en el suelo (bacterias y hongos), llama la atención los que se encuentran vinculados con los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes, pues a través de estos se genera la transformación de elementos como carbono, nitrógeno, oxígeno, hidrógeno, calcio, sodio, azufre, fósforo y potasio entre los seres vivos y la atmósfera o la biomasa (Vessey, 2003).

Es importante resaltar el potencial como control biológico que estos microorganismos representan, considerándolos como una alternativa importante dentro del manejo integrado de enfermedades. Tanto hongos como bacterias se han estudiado por su capacidad para controlar patógenos en un gran número de ambientes (Bueno *et al.*, 2012).

Las actinobacterias son bacterias muy abundantes en el suelo, y conocidas por desarrollar diversas actividades en el ecosistema, tales como el mejoramiento de la estructura del suelo (Franco-Correa, 2009). Son microorganismos filamentosos, gram positivos, no alcohol-ácido-resistentes, no móviles y no forman esporas, pueden predominar los filamentos con verdaderas ramificaciones y las colonias son evidentes después de 18-48 horas de cultivo. Las células difteroides o bacilos ramificados son comunes. Pueden ocurrir formas en “V”, “Y”, y “T”. Producen filamentos (o micelios) largos, por lo general entre 0.5 a 1.0 μm , su longitud es indefinida y el grado de ramificación depende de la cepa; raramente presentan actividad proteolítica, pero si está presente es débil. No produce indol, ureasa negativa. Estos microorganismos son aerobios, anaerobios facultativos, o anaerobios estrictos (Cross, 1981; Niemi *et al.*, 1982; Zaitlin *et al.*, 2003; Jensen y Fenical, 1994).

Los principales géneros de actinobacterias, que se aíslan a partir de suelos son *Micromonospora*, *Nocardia* y *Streptomyces*, pueden estar presentes como conidias o como hifas vegetativas (Martin 1981). Sin embargo los métodos de aislamiento convencionales muestran que el 95% de las actinobacterias aisladas a partir de suelo pertenecen al género *Streptomyces* (Lacey, 1973). El uso de técnicas moleculares para la detección de estas bacterias en diferentes ambientes ha demostrado la presencia de organismos de la clase *Actinobacteria* que no han podido ser aislados por técnicas tradicionales de cultivo (Rheims *et al.*, 1999).

Las actinobacterias son microorganismos generalmente saprófitos, se ha observado que comparten su entorno con otras bacterias y hongos filamentosos, formando una comunidad ecológica interconectada; han sido descritas tanto en ambientes naturales como modificados por el hombre, pueden desarrollarse sobre un amplio rango de sustratos como el sedimento, materia orgánica en descomposición, estructuras vegetales, en algunos organismos, agua dulce y salada (Meijer y Prescott, 2004).

Una de las características que distinguen a las actinobacterias del resto de las bacterias, es la capacidad de producir un amplio espectro de metabolitos secundarios que son utilizados con fines terapéuticos por su actividad como antineoplásicos, antibióticos, inmunomoduladores, inhibidores enzimáticos, etc (Pelaz-Guerra, 2014), este es uno de los principales motivos por los que la búsqueda hacia el descubrimiento de nuevos cultivos bioactivos se ha enfocado en el océano, en sus sedimentos, en plantas y animales acuáticos, los cuales ofrecen la posibilidad de hallar cepas no descritas y con la posibilidad de hallar metabolitos secundarios farmacológicamente activos (Fenical, 1993; Jensen y Fenical, 1994; Leiva *et al.*, 2000; Hentschel *et al.*, 2001; Cragg y Newman, 2001; Jiang y Xu, 1996). La lista de compuestos obtenidos a partir de microorganismos acuáticos incluyen: antimicrobianos, anticancerígenos y antiinflamatorios, muchos de los cuales pertenecen a clases químicas no descritas en microorganismos terrestres, estando algunos de ellos ya en etapa de evaluación clínica (Fenical, 1993; Jensen y Fenical, 1994; Cragg y Newman, 2001).

Antecedentes

México es uno de los principales países megadiversos del mundo, con alrededor de 200 mil especies diferentes, es el hábitat del 10 por ciento de la biodiversidad mundial (Mittermeier y Goettsch, 1992), en cuanto al número de especies, México es el quinto lugar en plantas, cuarto en anfibios, segundo en mamíferos y primero en reptiles (Groombridge y Jenkins, 2002), pero poco se conoce de su diversidad microbiológica.

Los océanos ocupan alrededor del 72% de la superficie de la Tierra. Sin embargo, aunque constituyen un enorme reservorio de biodiversidad, se estima que sólo el 15% de las especies conocidas pertenecen a este hábitat (Briggs, 1994). Actualmente se aprecian nuevas facetas de la biodiversidad marina que van desde las profundidades y las regiones polares, hasta los

niveles jerárquicos de organización biológica más bajos, constituidos por la diversidad inexplorada de las comunidades microbianas.

A inicios de los 90's, se hizo evidente la importancia del estudio de la microbiología marina, para comprender el papel que juegan los microorganismos en los procesos biológicos que ocurren en el océano. Además, el potencial de éstos para proveer productos naturales bioactivos (Barbier y Prieur, 1991). En las últimas dos décadas se ha demostrado que organismos desconocidos son el mayor reservorio potencial de genes útiles para ser usados en medicina y biotecnología, pues pueden poseer metabolismos aún no descritos que pueden ayudar el entendimiento de la evolución (Pedrós-Alió, 2006; Bull *et al.*, 2000; Maldonado *et al.*, 2009).

El número estimado de células procarióticas en el océano es de $\sim 1 \times 10^{29}$, lo que representaría entre un 90 y 98% de la biomasa oceánica, mientras que en sedimentos se tiene un estimado de $\sim 1 \times 10^{26}$ células (Whitman *et al.*, 1998; Sogún *et al.*, 2006), lo que indica que más del 90% no ha sido descrito e identificado (Mora *et al.*, 2011).

Por lo anterior aislar especies microbianas metabólicamente activas adaptadas al ambiente marino (autóctonas) realza la importancia actual del estudio de la microbiología marina, así como la diversidad microbiana de dicho ecosistema (Mincer *et al.*, 2002; Maldonado *et al.*, 2005a).

Las bacterias aisladas de agua y sedimentos marinos son microorganismos unicelulares microscópicos ($< 2 \mu\text{m}$ de tamaño), por la forma en que obtienen carbono para su desarrollo se dividen en autótrofos y heterótrofos; también encontramos divisiones en cuanto a su fuente de energía, los fotótrofos obtienen su energía a partir de la luz, los quimiolitótrofos a partir de la oxidación de compuestos inorgánicos; mientras que las bacterias heterótrofas, saprófitas y parásitas obtienen su energía a partir de materia orgánica (Kennish, 2001).

La clase *actinobacteria* es un grupo heterogéneo de bacterias gram positivas, con un alto contenido de Guanina y Citosina [G+C], dentro de esta clase predomina la forma de bacilos filamentosos por la presencia de hifas aéreas pero también pueden presentar morfología microscópica cocobacilar o difterioide ya que en algunos géneros de actinobacterias los filamentos se segmentan con gran facilidad durante el crecimiento dando origen a células

pleomórficas (Staley *et al.*, 2007), macroscópicamente algunos miembros presentan morfología colonial similar a las típicas colonias bacterianas pero con consistencia particularmente dura o rugosa. Evolutivamente está basado en el agrupamiento filogenético de la secuencia 16S rADN/rARN y la presencia oligonucleótidos en taxones específicos del gen 16S rADN/rARN, del grupo microbiano conocido de manera genérica como *actinomicetos* (Stackebrandt *et al.*, 1997).

La clasificación de los microorganismos pertenecientes a la clase actinobacterias tiene su fundamento en tres aspectos: 1) composición química de los componentes de su pared celular (peptidoglicano, lípidos polares, ácidos grasos y quinonas isoprenoides); 2) similitud entre los ADN de cadena sencilla de especies altamente relacionadas y 3) determinación de similitud de secuencias del gen 16S rADN (Stackebrandt *et al.*, 1997).

En un principio las actinobacterias se incluyeron entre los hongos porque su morfología y desarrollo presentaban gran similitud, dotados de un micelio verdadero, debido a estos se les denominó “hongos radiados”; sin embargo hoy en día, se sustenta muy bien su clasificación como bacterias (Koneman, 2001; Prescott, 2002).

Esta clase representa una de las más grandes unidades taxonómicas dentro de los 18 linajes reconocidos actualmente, dentro del dominio *Bacteria*, está compuesto por 5 subclases y más de 3000 especies (Goodfellow y Fiedler, 2010).

La distribución de estos microorganismos resulta ser abundante en ecosistemas terrestres, (Meijer y Prescott, 2004) pero también existe presencia tanto en aguas continentales como marinas (Leiva *et al.*, 2004). Dentro de sus características particulares presentan un olor típico a suelo húmedo por la producción de un metabolito llamado geosmina, adicionalmente presentan una actividad metabólica alta, producen terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares con lo que son capaces de degradar materia orgánica de origen vegetal y animal (Ezziyyani *et al.*, 2004).

En años recientes un gran número de nuevas especies y géneros de la clase *Actinobacteria* han sido aislados de ecosistemas marinos, (Magarvey *et al.*, 2004; Mincer *et al.*, 2002; Maldonado *et al.*, 2005b, Sogin *et al.*, 2006; Maldonado *et al.*, 2009). Los géneros *Salinispora* (Maldonado *et al.*, 2005a), *Solwaraspora* (Magarvey *et al.*, 2004), *Marinispora*

(Kwon *et al.*, 2006) y *Lamer spora* (Fortman *et al.*, 2005), son ejemplos de géneros exclusivos del ambiente marino.

Antes de 2005 sólo tres géneros de la clase *Actinobacteria* eran frecuentemente reportados como parte del ambiente marino (*Micromonospora*, *Rhodococcus* y *Streptomyces*) (Goodfellow y Haynes, 1984). Sin embargo hoy en día con el uso de técnicas de biología molecular para identificar la diversidad microbiana, se ha ido mostrando que la diversidad actinobacteriana presente en sedimentos marinos, es por mucho mayor a la que se estimaba y no se encuentra limitada a sólo tres géneros (Stach *et al.*, 2003; Magarvey *et al.*, 2004; Maldonado *et al.*, 2005b). Esta clase contiene las siguientes familias.

Familia *Corynebacteriaceae*

Previamente denominado *Corynebacterium*, los microorganismos pertenecientes a esta familia son bacilos gram positivos, aerobios estrictos, es la única familia de actinobacterias que contienen ácidos micólicos (β -hidroxiácidos- α -alquil ramificados) de alto peso molecular, estos permiten que las células resistan la decoloración, incluso la que se produce con la aplicación de alcohol ácido, por lo que estos microorganismos se denominan ácido-alcohol resistentes (Forbes, 2009). Los géneros que forman parte de esta familia son *Gordonia*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Skermania*, *Tsukamurella* y *Williamsia* (Goodfellow, 1992; Goodfellow y Maldonado, 2006).

La detección primaria de los ácidos micólicos se realiza haciendo tinción de Ziehl-Neelsen, pues esta tinción está destinada a bacterias ácido-alcohol resistentes (no se despintan) esta tinción aprovecha el contenido mantecoso (butiroso) de las paredes celulares para maximizar su detección (Forbes, 2009), aunque en general la detección se realiza por cromatografía de capa fina (TLC por su siglas en inglés), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés), así como cromatografía de gases (Baba *et al.*, 1997).

Familia *Micromonosporaceae*

Grupo actinobacteriano redescrito por Stackebrandt y colaboradores (1997). La familia *Micromonosporaceae* es una fuente importante de metabolitos bioactivos (después de la familia *Streptomyces*), siendo el género *Micromonospora* el más representativo con una producción cercana a los 740 metabolitos, destacando la gentamicina (Bérdy, 2005).

Sus características fenotípicas y quimiotaxonómicas se basan en su pared celular, la cual contiene ácido meso y/o 3-hidroxi-diaminopimélico del tipo gamma A1; también tienen presencia de azúcares arabinosa y xilosa en gran cantidad, además de otros azúcares en menos proporción (Koch *et al.*, 1996b).

Los géneros de la familia *Micromonosporaceae* que se han aislado a partir de sedimentos marinos son: *Micromonospora*, *Verrucosipora*, *Salinispora* y *Actinoplanes*, (Mincer *et al.*, 2002; Maldonado *et al.*, 2005a, 2009; Goodfellow y Fiedler, 2010).

Familia *Streptomycetaceae*

La familia *Streptomycetaceae* fue descrita por primera vez por Waksman y Henrici (1943). Originalmente esta familia albergaba sólo al género *Streptomyces*, pero Zhang *et al.* (1997) propusieron la inclusión del género *Kitasatospora*, y recientemente, un tercer género, *Streptacidiphilus*, se añadió (Kim *et al.*, 2003).

Son actinobacterias no ácido-alcohol resistentes, aeróbicas, gram-positivos, pueden producir una amplia gama de pigmentos responsables del color del micelio; son quimioorganótrofos (Kämpfer 2006), constituyen el 95% de las actinobacterias; tienen hifas no fragmentadas, un micelio aéreo extenso y conidias.

El ácido diaminopimélico (DAP), tiene tres tipos de estereoisómeros (LL, DD y meso DAP) los cuáles están contenidos dentro de la pared celular de las actinobacterias; en general los contienen en forma de LL o meso-DAP (Takahashi *et al.*, 1989), según Lechevalier y Lechevalier (1970), la determinación de los isómeros DAP es un criterio importante para la clasificación a nivel de género de actinobacterias, se sabe que la familia *Streptomycetaceae* contiene DAP en forma de LL, mientras que los miembros de la familia *Micromonosporaceae* y *Corynebacteriaceae* lo contienen en forma de meso-DAP, (Yamacuchi, T. 1965). También se ha establecido que las bacterias que poseen meso-DAP son más virulentas y causantes de infecciones más resistentes (Cirillo *et al.*, 1994).

En este contexto, es de señalar los pocos estudios publicados sobre las actinobacterias. Son bacterias conocidas por desarrollar diversas actividades en el ecosistema, tales como el mejoramiento de la estructura del suelo y producción de compuestos bioactivos, siendo los principales productores de antibióticos (Goodfellow y Fiedler, 2012).

Las actinobacterias también han sido descritas como agentes de biocontrol por la capacidad de producir enzimas biodegradativas como quitinasas, glucanasas, y otras involucradas en el papel del micoparasitismo que llevan a cabo estos microorganismos (Franco-Correa 1999; Tokala *et al.*, 2002; Márquez *et al.*, 2003). El género *Streptomyces* ha sido descrito como colonizador de la rizósfera, capaz de ejercer biocontrol sobre hongos fitopatógenos, producir sideróforos, sustancias promotoras del crecimiento vegetal *in vitro*, promover la nodulación, lo cual promueve el crecimiento vegetal (Tokala *et al.*, 2002).

Debido a la diferencia entre los medios acuáticos y terrestres, se podría esperar que las actinobacterias en su proceso de adaptación al ambiente acuático, hayan desarrollado habilidades estratégicas (como la supervivencia bajo presión y sedimentación), que les otorgan mayores posibilidades de supervivencia (Leiva *et al.*, 2004).

Objetivos

General:

Caracterizar fenotípicamente actinomicetos aislados de sedimentos marinos del Golfo de México

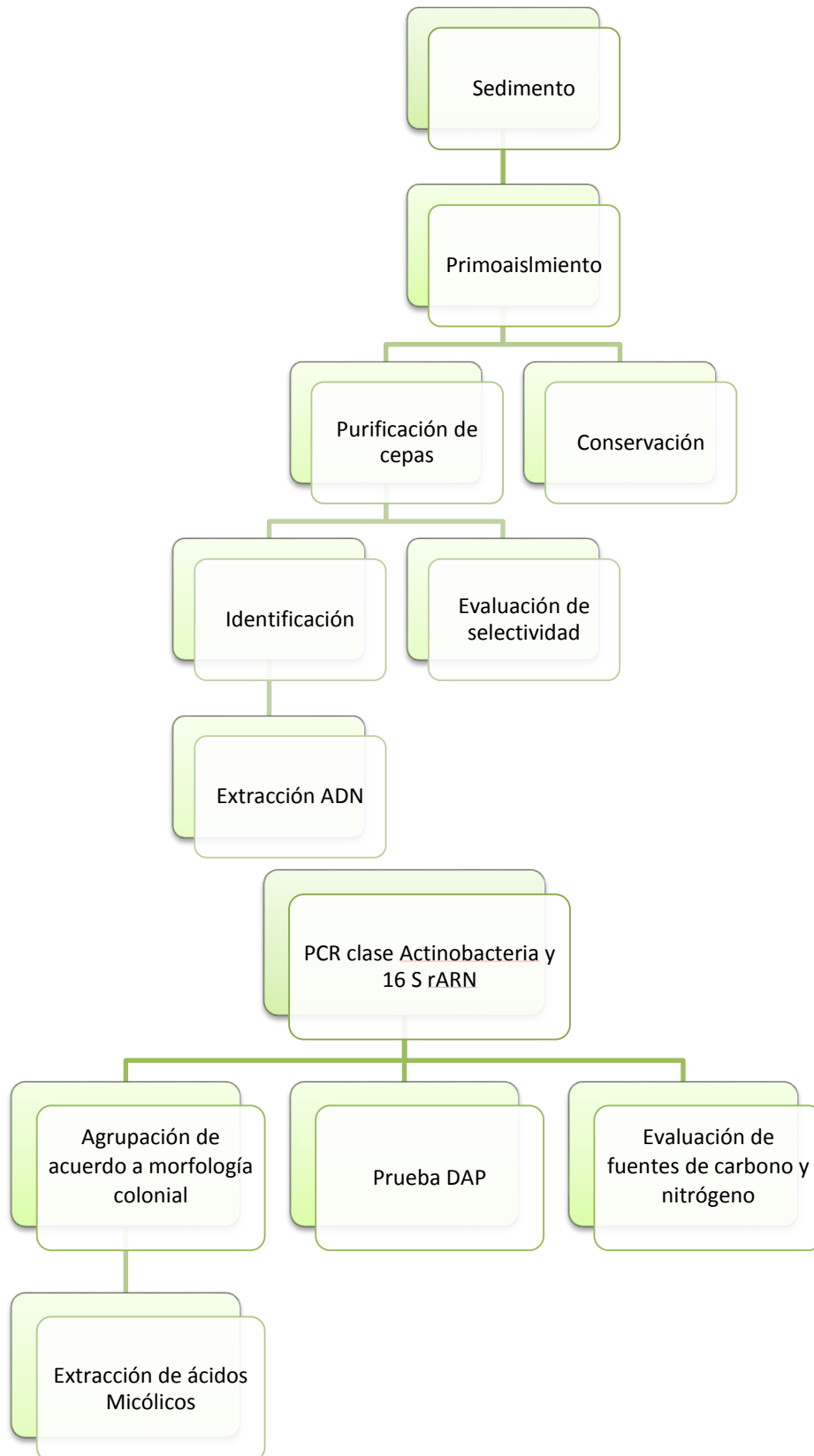
Específicos:

1. Determinar la selectividad de los aislados en diferentes medios de cultivo
2. Determinar cualitativamente si la producción de pigmentos carotenoides se ve afectada por la presencia de luz y oscuridad
3. Identificar la aproximación filogenética de los aislados
4. Determinar el isómero del ácido diaminopimélico en los aislados
5. Determinar si los pigmentos carotenoides corresponden a la presencia de ácidos micólicos
6. Evaluar el crecimiento de los aislados en distintos compuestos como única fuente de carbono y nitrógeno

Hipótesis

Los actinomicetos se distribuyen tanto en ambientes terrestres como marinos, se espera que los aislados recuperados a partir de sedimentos marinos provenientes del Golfo de México, fenotípica y genotípicamente compartirán características con sus géneros homólogos terrestres, además, posiblemente por tratarse de sedimentos de origen marino y las interacciones de este ambiente, los aislados podrán crecer mejor en fuentes de carbono y nitrógeno más complejas.

Métodos y materiales



De muestras obtenidas durante la campaña BIOREPES (Biodiversidad y Recursos Pesqueros del Golfo de México) realizada en el sureste del Golfo de México, a bordo del Buque Oceanográfico Justo Sierra, en 2008, se colectaron sedimentos con un nucleador de caja (*box corer*) tipo Gomex a una profundidad de 1000 m; posteriormente en un tubo tipo Falcón se preparó una solución con 9 mL de solución salina isotónica estéril (SSI, 0.9%) y un gramo de la muestra, se agitó durante una hora y se hicieron dos diluciones a partir de un original, con la finalidad de tener un medio con condiciones oligotróficas, que posiblemente es lo que los microorganismos encuentran en los ambientes acuáticos como el Golfo de México. Se sembró en medio de cultivo selectivo GYM marino concentrado con rifampicina 20 mg/mL (GYM·conc/R) y GYM marino con rifampicina (GYM·/R) (del inglés Agar Glucosa Extracto de Levadura y Malta, *Glucose Yeast extract Malt agar*), empleando agua marina en lugar de agua destilada para la elaboración del GYM denominado como “marino”, el antibiótico se añadió con la finalidad de favorecer el aislamiento de ciertos grupos bacterianos (actinobacterias) y limitar el crecimiento de bacterias “contaminantes”, pues su mecanismo de acción se basa en el bloqueo de la síntesis de ARN por inhibición de la ARN-polimerasa ADN-dependiente; cabe mencionar que estos procedimientos están bien documentados por trabajos previos Maldonado *et al.* (2005a).

Cada muestra se sembró por duplicado en los dos medios (GYM· y GYM·/R), se depositaron 60 µL y se extendió con una asa en “L”; las cajas Petri se incubaron a 30°C, debido a que el rango de temperatura de crecimiento va de 10°C a 37°C (Goodfellow y Maldonado, 2006), observándose su crecimiento a los 7 y 14 días. Después de 14 días, que se sembró se seleccionaron unidades formadoras de colonias (UFC), y se resembraron en GYM (sin antibiótico), se les asignó un código para identificarlas y se incubaron a 30°C y se dejaron crecer 14 días; este proceso de sembrar y dejar crecer se realizó dos veces para asegurar cultivos puros.

Se hicieron suspensiones de cada microorganismo puro para conservarlos, esta suspensión se hizo en tubos Eppendorf con 1 mL de solución salina y dos asadas del microorganismo.

Los aislados puros se agruparon con base en la morfología colonial de acuerdo a estándares establecidos universalmente, como: tamaño, forma, borde, color, superficie, luz reflejada,

elevación, presencia de pigmento difusible y consistencia, para de esta forma agruparles y seleccionar un representante de cada grupo.

Con la finalidad de saber si los microorganismos son selectivos a ciertos nutrientes se sembró por gota (75 μ L) en dos medios avena y GYM, se incubó a 30°C y se observó su crecimiento a los 7 días. Se sembraron todos los microorganismos.

De los 26 aislados preservados y purificados, se utilizaron cinco cepas tipo, por ser aquellas cuya coloración, borde, consistencia y elevación las hacías representativas (I-001, I-002, I-006, I-013, I-025), las cuales fueron utilizadas para los análisis posteriores.

Extracción de ADN

En tubos Eppendorf de 1.5 mL estériles y etiquetados, se añadieron dos asadas de biomasa de cada aislado y 1 mL de buffer TEN (pH 8), se mezcló en vórtex, posteriormente se añadió 20 μ L de la solución de lisozima (10 mg/mL en buffer TE pH 8), se incubó a 37°C por una hora, agitándose por inversión cada 10 minutos, transcurrido este tiempo se colocaron los tubos por 10 minutos en un baño de hielo-alcohol, para posteriormente incubar durante 5 minutos en un baño a 65°C; este proceso se repitió tres veces.

Después de este proceso se añadieron 100 μ L de SDS (dodecil sulfato de sodio, Promega, H5114) al 20% (p/v) y se agitó en vórtex por un minuto, se incubó nuevamente en un baño durante 30 minutos a 30°C, se centrifugó 10 minutos a 10000 xg a temperatura ambiente; se pasó el sobrenadante a un vial nuevo y se añadieron 500 μ L de acetato de potasio 5M (Sigma, P1190), se incubó durante 5 minutos a 65°C y 20 minutos en un baño de hielo-alcohol; se centrifugó durante 30 minutos a 12000 xg a 4°C.

Se pasó el sobrenadante a un nuevo vial, se añadió 200 μ L de la suspensión de óxido de silicio (SiO₂, Sigma, S5631) al 14% (p/v), se agitó por inversión durante 3 minutos, se centrifugó durante 2 minutos a 11000 xg a temperatura ambiente.

Se lavó la pastilla dos veces con 1 mL de etanol 70% (v/v) (Sigma, E7023) cuidando de no agitar, se centrifugó cada lavado durante 2 minutos a 11000 xg a temperatura ambiente,

posteriormente se decantó el contenido, para dejar evaporar el alcohol manteniendo los tubos abiertos por dos minutos sobre la mesa.

Se resuspendió la pastilla en 60 µL de agua destilada estéril, se incubó 5 minutos a 55°C con agitación ocasional, se centrifugó durante 5 minutos a 10000 xg a temperatura ambiente.

Se pasó el sobrenadante a un nuevo tubo cuidando de no tomar sílice. Los tubos se guardaron en congelación de -20 a -80°C para su uso posterior.

Electroforesis horizontal

Se verificó la calidad, cantidad e integridad del ADN en un gel de agarosa al 1%. Las condiciones de la electroforesis horizontal, se describen en el Anexo 1. En el primer carril se colocó el marcador, en los carriles 2 a 6 se colocó la muestra de ADN. Se observó el ADN en un transiluminador Gel Doc XR (BIO-RAD).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Después de comprobar la presencia de ADN, se realizó una reacción de PCR para amplificar la región conservada de las actinobacterias. Se utilizaron cebadores ACT254f [5'-CGCGGCCTATCAGCTTGTTG-3'] y ACT 894r [5'-CCGTACTCCCCAGGCGGGG-3'] (Stach *et al.*, 2003).

En la tabla 1 se enlistan los reactivos empleados para la mezcla de reacción, las condiciones bajo las cuáles se corrió el PCR clase actinobacteria fueron de un ciclo de pre-desnaturalización a 95°C por 10 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por un minuto, 55°C por un minuto de alineamiento, 72°C por un minuto de extensión y 72°C por 10 minutos de extensión final. Al final de todos los ciclos se configuró al termociclador para que este tuviera una temperatura final de 4°C.

Los resultados de la PCR, se analizaron y visualizaron por medio de electroforesis horizontal, siguiendo el procedimiento anteriormente descrito.

Tabla 1 Reactivos de mezcla de la PCR para clase actinobacteria 1x

Reactivo	Volumen(μL)
Buffer 10x (Bioline, EUA)	5.0
MgCl ₂ 50mM (Bioline, EUA)	1.5
dNTP'S 10mM (Bioline, EUA)	0.5
ACT 254f 10mM	1.0
ACT 894r 10mM	1.0
ADN	1.0
Taq polimerasa 5u/ μ L (Bioline, EUA)	0.2
H ₂ O	14.8

PCR del gen ribosomal 16S

Para realizar la amplificación del gen ribosomal 16S se utilizaron los cebadores 16Sf y 16Sr (Carroll *et al.*, 2000).

En la tabla 2, se muestran los reactivos empleados para la mezcla de reacción del PCR 16S, las condiciones bajo las cuales se corrió el PCR fueron de un ciclo de pre-desnaturalización a 95°C por un minuto, 29 ciclos de desnaturalización a 95°C por un minuto, 45°C por 45 segundos de alineamiento, 72°C por un minuto de extensión y 72°C por 5 minutos de extensión final. Al final de todos los ciclos se configuró al termociclador para que este tuviera una temperatura final de 4°C.

Tabla 2 Reactivos de mezcla de la PCR para 16S 1x

Reactivo	Volumen(μL)
Buffer 10x (Bioline, EUA)	5
MgCl ₂ 50mM (Bioline, EUA)	1.5
dNTP'S (Bioline, EUA)	0.5
16Sf 10mM	1.0
16Sr 10mM	1.0
ADN	1.0
Taq polimerasa 5u/ μ L (Bioline, EUA)	0.2
H ₂ O	14.8

También se utilizó la técnica de PCR anidada, que es una variante de la PCR convencional, con el fin de incrementar sensibilidad y especificidad de la detección se utilizaron cebadores 27f y 1525r (Lane, 1991).

Los componentes de la mezcla de reacción se enlistan en la Tabla 3, las condiciones bajo las cuáles se corrió el PCR fueron de un ciclo de predesnaturalización a 95°C por 10 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por un minuto, 55°C por un minuto de alineamiento, 72°C por un minuto de extensión y 72°C por 10 minutos de extensión final. Al final de todos los ciclos se configuró al termociclador para que este tuviera una temperatura final de 4°C.

Tabla 3 Reactivos de mezcla de la PCR para 16S anidada 1x

Reactivo	Volumen(μL)
Buffer 10x (Bioline, EUA)	5
MgCl ₂ 50mM (Bioline, EUA)	1.5
dNTP'S (Bioline, EUA)	0.5
27f 10mM	1.0
1525r 10mM	1.0
Producto PCR clase actinobacteria	1.0
Taq polimerasa 5u/μL (Bioline, EUA)	0.2
H ₂ O	14.8

Posterior a este procedimiento se realizó una purificación del gen 16S utilizando el equipo de purificación Wizard SV Gel and PCR *clean-up System* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos se analizaron nuevamente con una electroforesis horizontal, utilizando como concentraciones 1 μL de colorante, 2 μL de muestra y en el caso del marcador se utilizó 0.9 μL. Los productos se etiquetaron y almacenaron a -20°C para ser mandados a secuenciar.

Determinación de los isómeros del ácido diaminopimérico

En crioviales estériles de 1.5 mL previamente etiquetados con la clave correspondiente a cada aislado, se agregaron 500 μL de ácido clorhídrico 6 N, 100 μg de perlas de vidrio (Sigma-

Aldrich, México) y dos asadas de biomasa fresca de cada microorganismo, se homogenizaron durante 10 minutos a máxima velocidad en un vórtex. Posteriormente se colocaron durante 4 horas en un horno de convección ajustado previamente a 100°C, transcurrido el tiempo se retiraron los crioviales y se enfriaron a temperatura ambiente durante 5 minutos, se agitó en un vórtex a máxima velocidad y posteriormente se centrifugó a 6000 xg durante 5 minutos.

El sobrenadante de cada criovial se transfirió a un tubo Eppendorf previamente etiquetado y estéril de 1.5 mL, se dejaron con la tapa abierta durante 2 horas para que el contenido se evaporara en una parrilla de calentamiento ajustada a una temperatura de 100°C; transcurrido este tiempo y que estaba perfectamente evaporado el líquido se añadieron 500 µL de agua destilada estéril, re suspendiendo el líquido, se volvieron a colocar en la parrilla con la tapa abierta, durante 40 minutos a 100°C, con el contenido seco se volvió a re suspender el contenido con 500 µL de agua destilada estéril y se volvió a dejar secar por 40 minutos a 100°C, posteriormente se añadieron 100 µL de agua destilada estéril y se re suspendió el contenido, inmediatamente el líquido se transfirió a otros tubos Eppendorf estériles y etiquetados, y se centrifugaron durante 5 minutos a 6000 xg. El contenido nuevamente se transfirió a otros crioviales estériles, se almacenaron las muestras a 4°C.

La visualización de los isómeros del DAP se realizó en una placa de cromatografía en capa fina de dimensiones 20 cm x 20 cm, con un espesor de 0.5 mm (Merck #5716). En cada carril se aplicaron 3 µL de muestra, con 1 cm de separación entre cada muestra; esto se hizo con la ayuda de un aplicador semiautomático, Linomat 5 (LAMAG, Tecrom Group). La placa de TLC se reveló en un tanque con metanol:agua:HCL-6N:Priridina, en una proporción 80:26:4:10 (v/v) hasta que la fase móvil llegó al otro extremo de la placa, pasado el tiempo la placa se retiró del tanque y se dejó secar a temperatura ambiente durante 15 minutos en una campana de extracción, transcurrido este tiempo la placa se roció con una solución de ninhidrina (0.2%) disuelta en acetona, se dejó secar por otros 15 minutos y transcurrido este tiempo se colocó por 3 minutos a 100°C en una placa de calentamiento (CAMAC) y se observó la placa de DAP comparando contra los estándar.

Extracción de ácidos micólicos

Se hizo una modificación al protocolo de Minnikin *et al.*, (1985a). En crioviales previamente esterilizados y etiquetados se añadieron 500 μL de hidróxido de tetrabutilamonio (TBHA, Sigma-Aldrich, EUA) al 5%; 100 μg de perlas de vidrio, lavado ácido (Sigma-Aldrich, EUA) y dos asadas de biomasa de cada aislado crecido en medio GYEA, los crioviales se pasaron por vórtex (DAIGGER, GENIE 3, USA) durante 5 minutos a máxima velocidad; Posteriormente se colocaron en un horno de convección a 100°C durante 2 horas. Transcurrido el tiempo, se sacaron los crioviales y se dejaron enfriar, las muestras se metieron en la centrífuga Mini Spin plus (Eppendorf, USA) durante 5 minutos a 5000 rpm.

En otros crioviales estériles y etiquetados se añadió 1 mL de diclorometano (PROLABO), 25 μL de yodo-metano (Aldrich, EUA) y se transfirió el sobrenadante de los crioviales anteriores, utilizando una micropipeta P20 para cada muestra. Las muestras se pusieron a mezclar en un rotador de ángulo ajustable durante 30 minutos; posteriormente se centrifugaron durante 5 minutos a 5000 rpm.

En unos tubos Eppendorf, estériles y etiquetados se transfirió la fase inferior de los crioviales con pipeta pasteur (Sigma, México) y se dejó evaporar el contenido del tubo a sequedad en un bloque metálico a 100°C. Se colocaron 100 μL de éter de petróleo y se resuspendió el contenido en el tubo.

Las muestras se colocaron en una placa de aluminio de 10 x 10 cm cubierta con dióxido de silice, con un espesor de 0.5 mm (Merck), en cada carril se aplicaron 10 μL de muestra, con 1 cm de separación entre cada muestra; esto se hizo con la ayuda de un aplicador semiautomático, Linomat 5 (LAMAG, Tecrom Group); para revelar la placa se preparó un tanque para cromatografía, con éter de petróleo:acetona, en una proporción 95:5 y se dejó saturar durante 10 minutos; la placa se dejó dentro de la cámara hasta que la fase móvil llegó al final de la placa; se sacó y se dejó secar durante 15 minutos en la campana de extracción, nuevamente la placa se volvió a meter en él tanque hasta que llegó la fase móvil al final de esta. Con la finalidad de tener una correcta separación de los ácidos micólicos; se sacó la placa y se dejó enfriar por 10 minutos en la campana de extracción, transcurrido este tiempo se colocó por 5 minutos a 180°C en una placa de calentamiento (CAMAC) y se observó la

placa de MAC comparando contra los estándar, la presencia de ácidos micólicos se confirmó al observar puntos oscuros en un fondo amarillo verdoso Minnikin *et al.*, (1985a).

Fuentes de carbono y nitrógeno

Se evaluó el crecimiento de las cepas de referencia I001, I002, I006, I013 y I025 en 17 fuentes de carbono y 8 de nitrógeno.

Tabla 4 Fuentes de carbono utilizadas en el análisis

Fuente de carbono	Tipo	Fuente de carbono	Tipo
Ácido malónico	Ácido dicarboxílico	Lactosa	Disacárido
Arabinosa	Monosacárido	Maltosa	Disacárido
Celobiosa	Disacárido	Manitol	Poli-alcohol
Celulosa	Polisacárido	Manosa	Monosacárido
Dextrano	Polisacárido	Ribitol	Alcohol
Fructosa	Monosacárido	Sacarosa	Disacárido
Galactosa	Monosacárido	Sorbitol	Poli-alcohol
Glicerol	Glicol	Xilosa	Monosacárido
Inositol	Poliol		

Tabla 5 Fuentes de nitrógeno utilizadas en el análisis

Fuente de Nitrógeno	Tipo	Fuente de Nitrógeno	Tipo
Alanina	Aminoácido (alifático)	Ornitina	Aminoácido (bibásico)
Arginina	Aminoácido (básico)	Prolina	Aminoácido (alifático)
Aspargina	Aminoácido (ácido)	Serina	Aminoácido (hidroxilado)
Histidina	Aminoácido (básico)	Triptofano	Aminoácido (aromático)

Se pesó 1 g de las fuentes de carbono y 0.1 g de las fuentes de nitrógeno; se disolvió respectivamente en 20 mL de agua bidestilada; las fuentes de carbono y nitrógeno se esterizaron utilizando el procedimiento de tindalización, el cual consiste en calentar a 100°C durante 30 minutos, por tres días consecutivos; el último día de tindalización se preparó medio basal para fuentes de nitrógeno, y medio ISP-9 para las fuentes de carbono. Se esterilizó durante 15 minutos y se dejó enfriar el medio aproximadamente a 45°C, dentro de

la campana de flujo laminar, para posteriormente verter la fuente de carbono o nitrógeno, según fuera el caso, en cajas de petri, estériles y etiquetadas.

Se inocularon por medio de gota, 7 μL de suspensión, en cada caja se colocaron 5 microorganismos, se incubó a 28°C durante 21 días, se hicieron evaluaciones el día 7, 14 y 21 a partir de la inoculación, se observó y calificó la producción de biomasa (crecimiento), siendo 1 mínimo y 4 máximo, la producción de pigmento, siendo 1 mínimo y 5 máximo, así como su consistencia.

Resultados y Discusión

En general a partir del primoaislamiento pudo observarse coloración naranja, amarillo brillante y amarillo claro, algunas fueron brillantes y otras opacas, de borde entero, aunque algunas ondulado o filamentoso, su elevación se observó convexa y plana, consistencia suave-mantecosa (butirosa) y con superficie lisa. También se observó que algunas colonias amarillas claras comenzaron a cambiar su coloración a tonalidades naranjas en los primeros 7 días y a los 14 días la coloración naranja fue más abundante que amarilla (Anexo Figura 12), en la Figura 18 (Anexo) se observó la misma tendencia a diferencia que esta colonia se ve casi totalmente naranja y con una mancha amarilla.

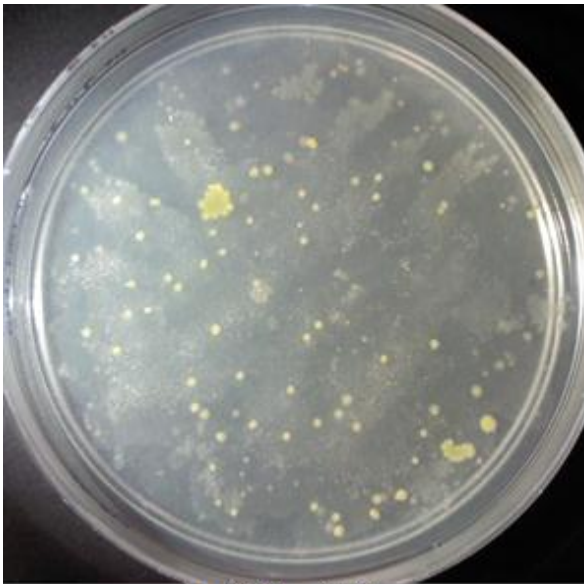


Figura 1. Cultivo en GYM-/R

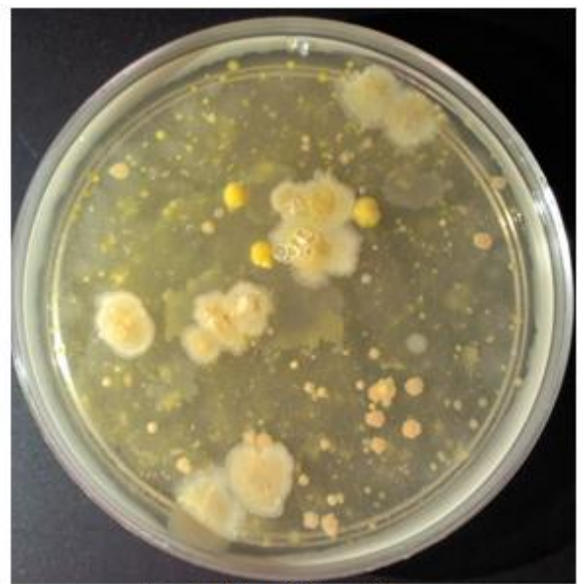


Figura 2. Cultivo en GYM·conc/R

Del primoaislamiento se obtuvieron 68 UFC, de las cuales 39 correspondieron a las cultivadas en GYM-/R y 29 en GYM·conc/R. Posteriormente se aislaron y resembraron las 68 UFC en GYM·conc; poniendo 4 colonias por caja.

Las bacterias del orden *Corynebacterineae* a menudo contienen gránulos metacromáticos, las colonias de algunas especies son regularmente amarillas-anaranjadas y en ciertas ocasiones presentan coloración desigual dependiendo de su crecimiento, esta coloración generalmente se debe a pigmentos carotenoides, la formación de estos pueden o no requerir exposición a la luz; son circulares, convexas con márgenes enteros, brillantes, producen fosfatasa y fermentan glucosa (Serrano y Sandoval, 2005).

Debido a la consistencia mantecosa (butirosa), probablemente se cuenta con microorganismos productores de ácidos micólicos, pues esta consistencia se debe a la presencia de ceras presentes en estos microorganismos, según lo reportado por (Goodfellow y Maldonado, 2006), la consistencia suave-mantecosa (butirosa) generalmente se observa en los géneros *Dietzia*, *Rhodococcus*, *Gordonia* y *Tsukamurella*.

Posteriormente se realizó una suspensión de las 26 colonias puras, que se pudieron recuperar de las 67 que se tenían originalmente, debido a que algunas se contaminaron y otras dejaron de crecer haciendo imposible su recuperación.

Posteriormente en la evaluación de selectividad en medio avena (tabla 6), contra GYM (tabla 7), se observó que los aislados tienen características fenotípicas diferentes; es decir en general los crecidos en avena tienen mediano crecimiento (++) y se observó coloración beis; caso distinto en los crecidos en GYM; en donde el crecimiento fue alto (+++) y la coloración fue naranja y amarilla.

Tabla 6 Microorganismos sembrados en medio Avena. Mínimo+, Máximo+++
AVENA

NO. DE COLONIA	Crecimiento	Color	Forma	Observaciones
I-001	++	Beis	Plana con borde	Borde beis
I-002	–	–	–	
I-003	++	Beis	Plana con borde	Borde beis
I-004	+	Beis	Plana sin borde	
I-005	++	Beis	Plana sin borde	
I-006	++	Beis	Plana con borde	Borde beis, la colonia tiene un punto naranja
I-007	–	–	–	

I-008	++	Beis	Plana sin borde	
I-009	++	Beis	Plana con borde	Borde beis
I-010	+	Beis	Plana con borde	Borde beis
I-011	++	Beis	Plana con borde	Borde beis
I-012	++	Beis	Plana con borde	Borde beis
I-013	+	Beis	Plana sin borde	Contaminada con otra colonia
I-014	++	Beis	Plana con borde	Borde beis
I-015	–	–	–	
I-016	++	Beis	Plana con borde	Borde beis
I-017	++	Beis	Plana con borde	Borde beis
I-018	++	Beis	Plana con borde	Borde beis
I-019	++	Amarillo	Plana con borde	Borde amarillo
I-020	++	Beis	Plana con borde	Borde beis
I-021	++	Beis	Plana con borde	Borde beis
I-022	++	Beis	Plana con borde	Borde beis
I-023	++	Beis	Plana con borde	Borde beis
I-024	–	–	–	
I-025	–	–	–	
I-026	–	–	–	

Tabla 7 Microorganismos sembrados en medio GYM. Mínimo+, Máximo+++

GYM

NO. DE COLONIA	Crecimiento	Color	Forma	Observaciones
I-001	+++	Naranja	Convexa con borde ondulado	Borde naranja
I-002	+++	Amarillo	Plana sin borde	
I-003	+++	Naranja	Convexa con borde ondulado	Borde naranja
I-004	+++	Naranja	Convexa con borde ondulado	Borde naranja

I-005	+++	Naranja	Convexa con borde ondulado	Borde naranja
I-006	+++	Amarillo	Convexa sin borde	
I-007	+++	Naranja	Convexa con borde ondulado	Borde naranja con tonos amarillos
I-008	+++	Amarillo con Naranja	Sin forma redonda	
I-009	–	–	–	
I-010	–	–	–	
I-011	+++	Naranja	Convexa sin borde	
I-012	+++	Naranja	Convexa con borde ondulado	Borde naranja
I-013	+++	Naranja opaco	Convexa sin borde	
I-014	+++	Naranja	Convexa con borde ondulado	Borde naranja
I-015	++	Amarillo con Naranja	Convexa sin borde	
I-016	+++	Naranja	Convexa con borde ondulado	Borde naranja
I-017	–	–	–	
I-018	+++	Naranja	Convexa con borde ondulado	Borde naranja
I-019	+++	Amarillo opaco	Plana sin borde	
I-020	+++	Naranja	Plana sin borde	
I-021	++	Naranja	Convexa con borde ondulado	Borde naranja con tonos amarillos
I-022	+++	Naranja	Convexa con borde ondulado	Borde naranja con tonos amarillos
I-023	+++	Naranja	Convexa con borde ondulado	Borde naranja
I-024	++	Amarillo	Convexa con borde ondulado	Borde amarillo opaco
I-025	++	Amarillo	Convexa con borde ondulado	Borde amarillo
I-026	++	Amarillo	Convexa con borde ondulado	Borde amarillo opaco

Extracción de ADN

En la figura 3 se muestra un gel de agarosa al 1% donde se observan las bandas de ADN sin degradación ni contaminación de las cepas representativas. El producto de PCR empleando cebadores específicos para la clase Actinobacteria se muestra en la figura 4; la extracción de ADN y el producto de PCR de cepas representativas permitieron la obtención de un amplicon

con una longitud de más de 10000 pb y aproximadamente 700 pb respectivamente. Del producto de 16S se obtuvo una secuencia aproximada 900 pb y para el 16S anidado de 1500 pb.

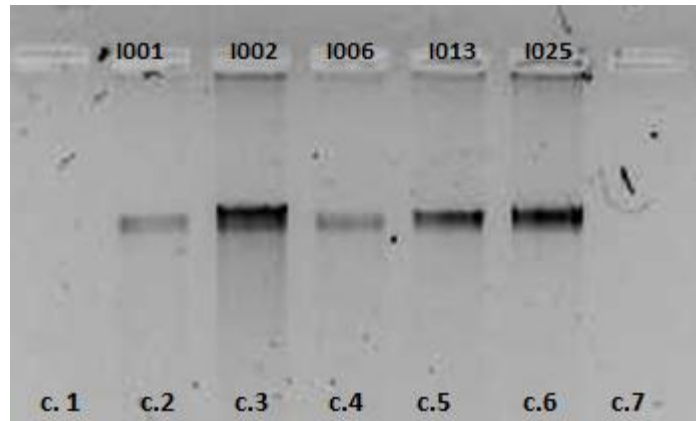


Figura 3 Extracción de ADN de cepas representativas carril 2: I001, carril 3: I002, carril 4: I006, carril 5: I013, carril 6: I025.

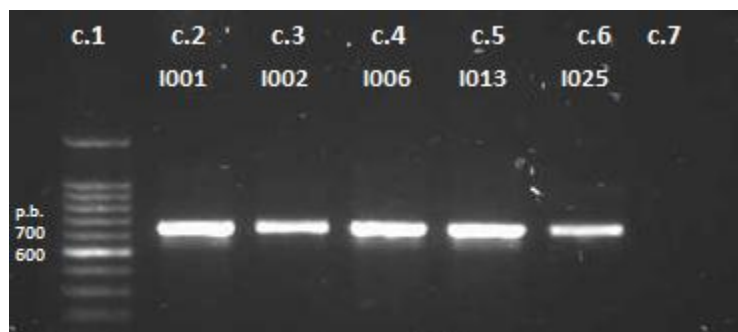


Figura 4 Producto de PCR clase actino, de cepas representativas, Carril 1 en pares de bases (pb), carril 2: I001, carril 3: I002, carril 4: I006, carril 5: I013, carril 6: I025.

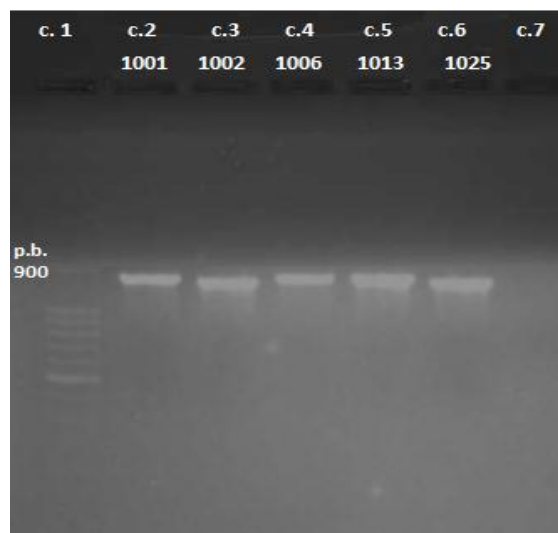


Figura 5, Producto de PCR 16S de cepas representativas, carril 1 marcador en pares de bases (pb), carril 2: I001, carril 3: I002, carril 4: I006, carril 5: I013, carril 6: I025.

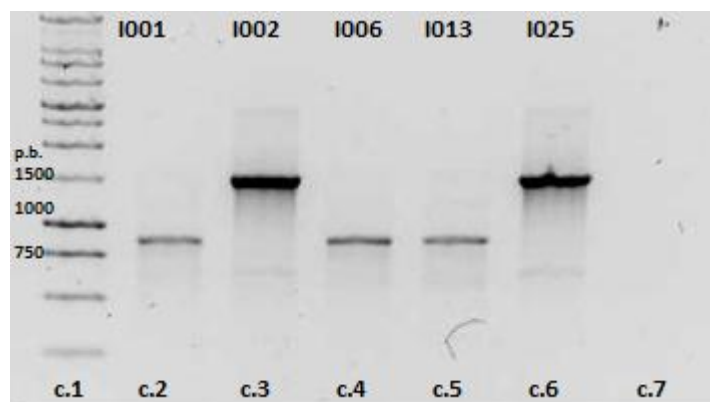


Figura 6 Producto de PCR clase actino 16S de cepas representativas, Carril 1 marcador en pares de bases (pb), carril 2: I001, carril 3: I002, carril 4: I006, carril 5: I013, carril 6: I025.

Se observó que con el uso de cebadores específicos para la clase actinobacteria 16S 27F/1525R los aislados I002 e I025 amplifican a 1500 pb; mientras que el resto de los aislados lo hacen pero aproximadamente por los 100 pb. Estos resultados en cierta manera coinciden por lo descrito por Lilja (2013), quién comparó los cebadores 16S para actinobacterias tradicionalmente usados y los cebadores 704F/1492R; cuando los cebadores fueron sustituidos se pudo recuperar el producto del PCR para ser analizado; encontró que en algunos casos sólo uno de los fragmentos podía ser amplificado, lo que indica una mutación en el sitio de unión del cebador; concluyendo en la necesidad de trabajar con más de 100 aislados para considerar el efecto acumulado del cribado en comunidades marinas; pero también es necesario hacer hincapié en el sesgo de cultivar comunidades microbianas a partir de sedimentos marinos o agua de mar; pues se estima que la cultivabilidad es de 0.25% (Amann *et al.*, 1995).

Determinación del isómero del ácido diaminopimélico (DAP)

Todas las cepas evaluadas (figura 6) contienen ácido diaminopimélico en forma de meso A₂pm. Según Lechevalier y Lechevalier, (1970) existen cinco tipos de pared celular según sus constituyentes mayoritarios, dentro de los ejemplos representantes encontramos a *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Saccharopolyspora*; por lo que se podría deducir que las muestras presentan una pared celular tipo IV, cuyos componentes mayoritarios son ácido meso-DAP, arabinosa y galactosa. En la figura 6, se puede observar y por lo tanto afirmar que ninguna muestra pertenece al género *Streptomyces*, esto porque todas las cepas evaluadas contienen DAP en forma de meso, según la muestra de referencia (carril 3, meso.DAP).

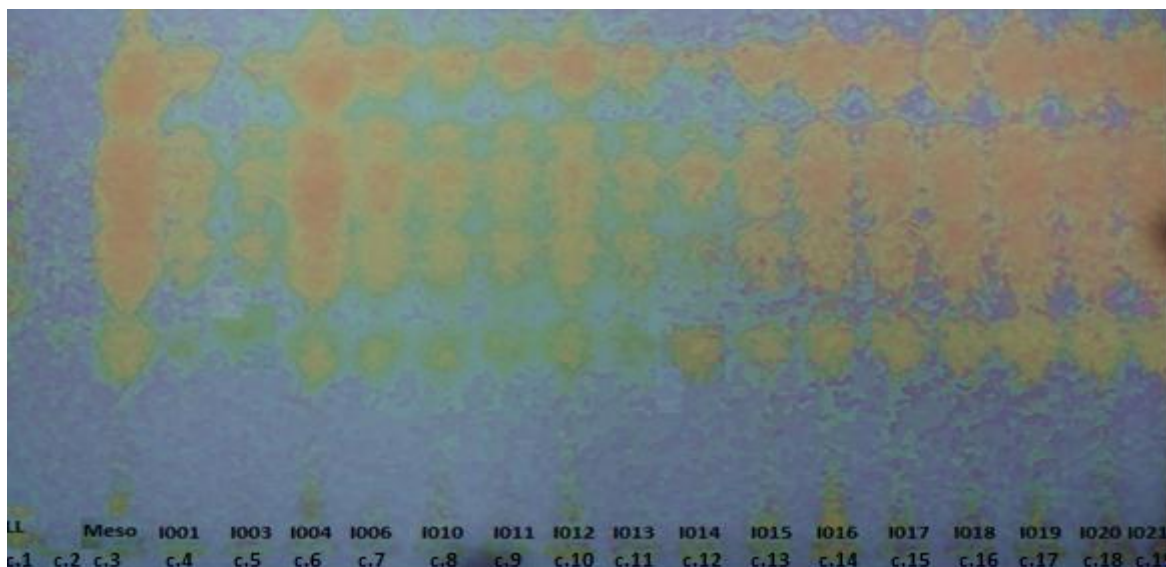


Figura 6 Determinación del Isómero del ácido diaminopimélico

1: LL, 2: blanco, 3: meso-DAP, 4: I001, 5: I003, 6: I004, 7: I006, 8: I010, 9: I011, 10: I012, 11: I013, 12: I014, 13: I015, 14: I016, 15: I017, 16: I018, 17: I019, 18: I020, 19: I021.

En la actualidad la determinación del isómero del ácido diaminopimélico (DAP) sigue siendo útil para caracterizar a los miembros del orden Actinomycetales aunque para hacer una identificación correcta se debe hacer uso de técnicas moleculares. Pese a que se podría considerar que la cromatografía en capa fina es una técnica poco utilizada para los actinomicetos es una técnica muy utilizada y sigue siendo necesaria para la determinación del DAP (Thawai *et al.*, 2008; Kirby *et al.*, 2010; Carro *et al.*, 2012). Esta no sólo nos brinda resultados sobre la presencia o ausencia de isómeros, sino del tipo específico al que pertenece.

Determinación ácidos micólicos (MAC)

Tanto en las cepas control, (*Tzukamurella*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Gordonia*, y *Rhodococcus*) como en las cepas evaluadas, se detectaron ácidos micólicos (figura 7). En la cepa utilizada como control negativo (*Streptomyces*) no se detectaron ácidos micólicos. Todas las cepas evaluadas se encuentran dentro de un intervalo de 0.2 a 0.5, lo que comprende a los MAME's. La importancia de esta prueba radica en que los mycolata son las únicas bacterias que contienen ácidos micólicos, por lo tanto este marcador quimiotaxonómico es el más útil para detectar cepas pertenecientes al suborden *Corynebacterineae* por la relación de

frente (Rf), utilizando cepas de referencia (carril 1 a 6), por el Rf de las muestras del carril 8 a 19 podrían tenerse representantes de *Rhodococcus*. Todas las manchas con Rf comprendido entre 0.2 y 0.5 son metil ésteres de los ácidos micólicos (MAME's), las marcas con un Rf superior a 0.6 corresponden a metil ésteres de ácidos grasos monohidroxilados (FAME's) (Minnikin *et al.*, 1980).

Recientes estudios han demostrado que el medio de cultivo puede influir en el perfil de ácidos micólicos en micobacterias (Wick *et al.*, 2002). Estos ácidos grasos de cadena larga están implicados en la arquitectura inusual y la impermeabilidad de la envoltura celular de estas bacterias (Portevin *et al.*, 2004).

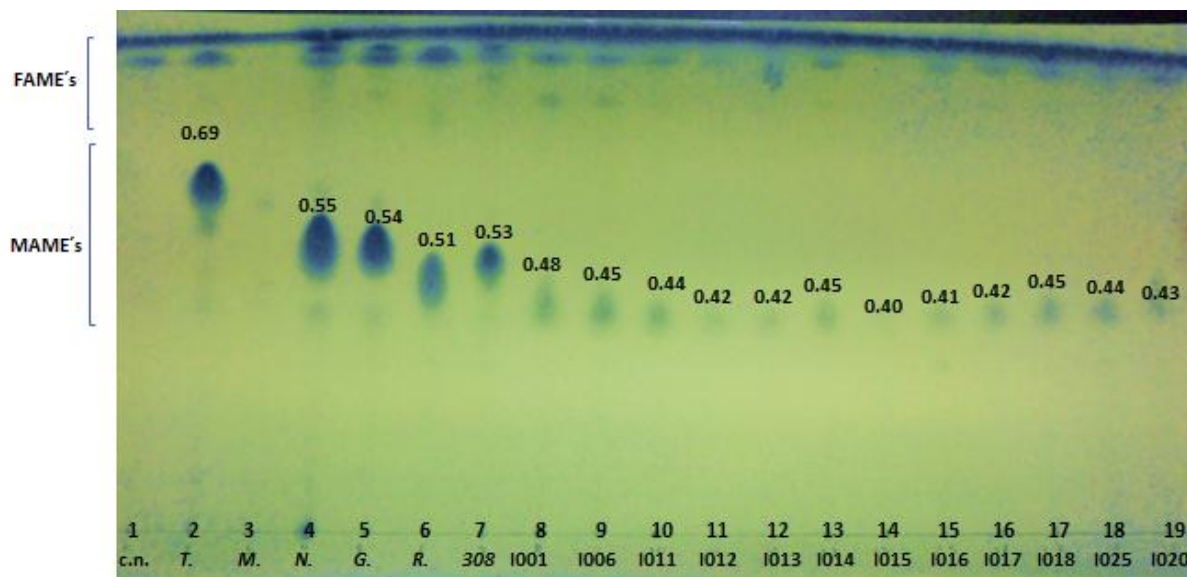


Figura 7 Cromatografía de capa fina de aislados

1: control negativo, 2: *Tzukumurella*, 3: *Mycobacterium*, 4: *Nocardia*, 5: *Gordonia*, 6: *Rhodococcus*, 7: 308, 8: I001, 9: I006, 10: I011, 11: I012, 12: I013, 13: I014, 14: I015, 15: I016, 16: I017, 17: I018, 18: I025, 19: I020

El alto contenido de ácidos micólicos en la pared celular hace que todas las especies exhiban una elevada hidrofobicidad en algún estadio de su ciclo de crecimiento, aunque esta característica varía según las especies, y en algunos casos con la edad del cultivo y con la riqueza del medio en contenido de carbono y nitrógeno. Se ha comprobado que la composición de los ácidos micólicos varía con la edad del cultivo, temperatura de crecimiento y fuente de carbono (Stratton *et al.*, 1997, Sokolovská *et al.*, 2003).

Según el modelo descrito por Minnikin (1985a) sobre la estructura de la pared celular de los microorganismos con ácidos micólicos estos pueden llegar a representar el 30% de la pared celular.

Las mejoras en la clasificación de los actinomicetos que contienen ácidos micólicos han proporcionado un marco para el reconocimiento de nuevos patógenos oportunistas en taxones establecidos, tales como los géneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium* y *Nocardia*; y en taxones recién descritos, sobre todo los géneros *Dietzia*, *Gordonia*, *Rhodococcus* y *Tsukamurella* (McNeil y Brown, 1994; Goodfellow *et al.*, 1998, 1999; Brown-Elliott *et al.*, 2006).

Al comprobar la presencia de actinobacterias con contenido de ácidos micólicos y con el apoyo de investigaciones previas, se sugiere que los microorganismos que sintetizan ácidos micólicos (MAC por sus siglas en inglés) son excelentes candidatos para estudiar la producción de pigmentos carotenoides (Miguel *et al.*, 2000; Veiga-Crespo *et al.*, 2005; Maldonado *et al.*, sin publicar).

De manera cualitativa se observó la producción de pigmentos, en lotes bajo condiciones controladas de oscuridad y luz.

Se esperaba observar una diferencia marcada entre los lotes cubiertos y los lotes en condiciones de luz, pues se sabe que las bacterias MAC prefieren condiciones de oscuridad, pero esta diferencia no se encontró definida, pues la pigmentación fue intensa en ambos casos; por otro lado según Timpe y Runyon (1954) propusieron una clasificación para las bacterias productoras de ácidos micólicos en cuatro grupos, de acuerdo con la velocidad de crecimiento (lento ≥ 7 días y rápido ≤ 7 días), y la producción de pigmento en presencia o ausencia de luz (fotocromógenas, escotocromógenas y no cromógenas), por lo que estamos frente a bacterias no cromógenas.

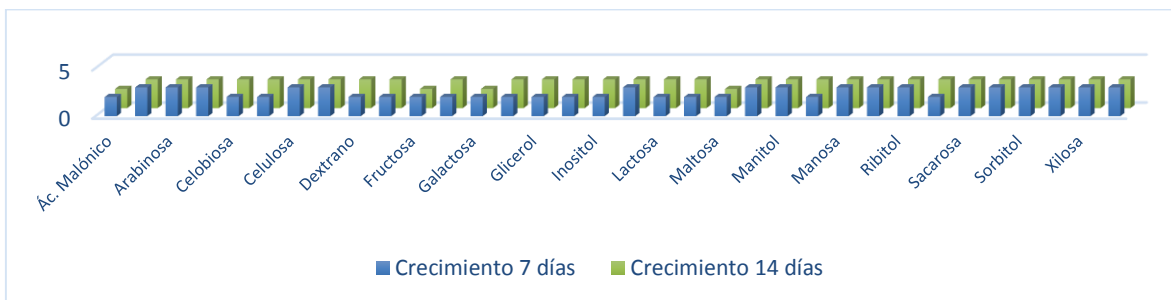
Se ha comprobado que los ácidos micólicos son los responsables de la actividad inductora de pigmento (Onaka *et al.*, 2011), los ácidos micólicos se encuentran en la capa externa de bacterias que pertenecen al orden *Corynebacteriaceae*, los cuáles están ligados a arabinogalactano, trehalosa, y proteínas, que son componentes importantes de la barrera exterior altamente impermeable (Huc *et al.*, 2010).

Fuentes de carbono

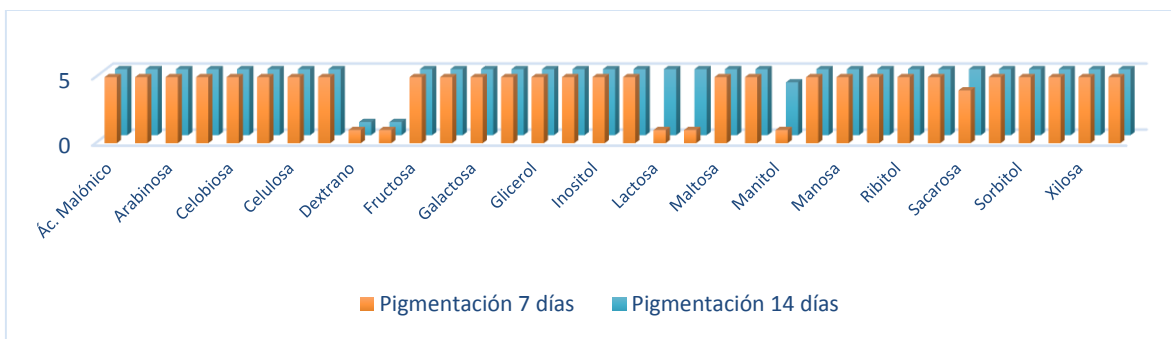
Se sabe que la concentración de 1.0% para las fuentes de carbono es el punto máximo para la producción de biomasa y pigmento (Barragán, 2009). Se observó que la biomasa en la mayoría de las colonias aumentó constantemente, hasta transcurridos los 14 días de incubación, y pasado este periodo el crecimiento se mantiene. Lo anterior indica además indirectamente la cinética de crecimiento del microorganismo. Por lo cual sólo se discute el crecimiento de los días 7 y 14. También se observó que la pigmentación principalmente en los aislados I002, e I025, se vuelve más intensa a los 14 días de incubación.

Tomando en cuenta que para esta evaluación cualitativa, se consideraron tanto para las fuentes de carbono como nitrógeno los valores 1 como mínimo y 4 como máximo para la producción de biomasa y 1 mínimo y 5 máximo para la pigmentación, se discute lo siguiente.

En general para el aislado I001 (gráfica 1 y 2), se observó un crecimiento alto (3), en las 17 fuentes de carbono evaluadas, la pigmentación osciló entre el naranja claro, naranja y rojizo; aunque como caso excepcional se observó que la producción de biomasa y pigmento, se ve disminuido cuando se crece en presencia de dextrano.



Gráfica 1 Crecimiento en fuentes de carbono (con duplicado), de la cepa I001

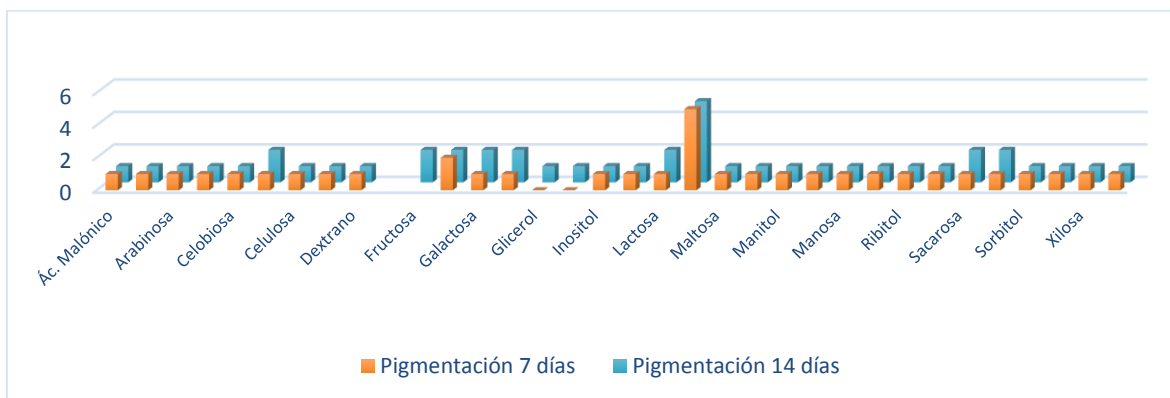


Gráfica 2 Pigmentación en fuentes de carbono (con duplicado), de la cepa I001

Para el aislado I002 (gráfica 3 y 4), la producción de biomasa utilizando fructosa y xilosa como fuente de carbono es alta (3), mientras que para el resto de las fuentes el crecimiento oscila entre 1 y 2, incluyendo dextrano, aunque en una repetición no hubo crecimiento.



Gráfica 3 Crecimiento en fuentes de carbono (con duplicado), de la cepa I002

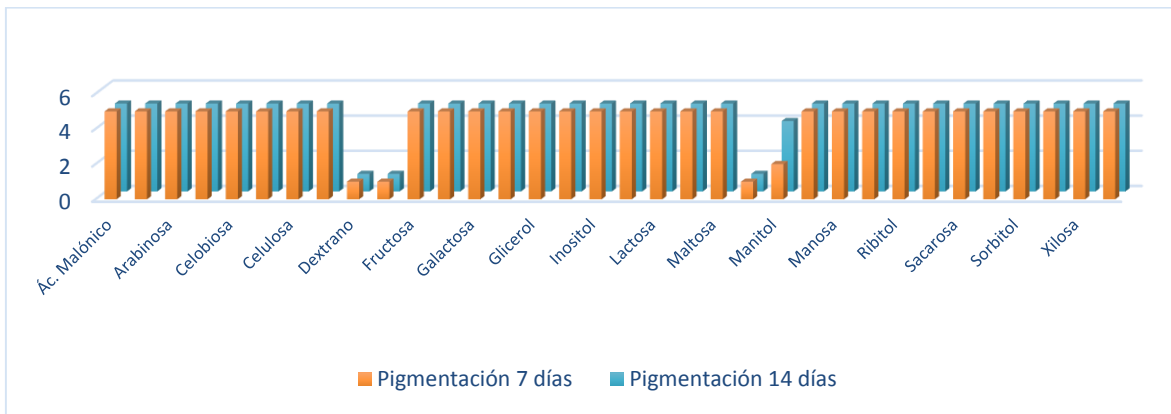


Gráfica 4 Pigmentación en fuentes de carbono (con duplicado), de la cepa I002

La producción de pigmentos en el aislado I006 (gráfica 5 y 6), en general fue el más alto de los cinco aislados, en arabinosa la biomasa fue la máxima (4), mientras que en las demás fuentes osciló entre 2 y 3; específicamente en el caso de dextrano el crecimiento fue de 2, pero la coloración aun pasando los 14 días sigue presentándose beige; seguramente esto se debe a que el dextrano es un polisacárido ramificado, complejo de metabolizar para estos aislados.

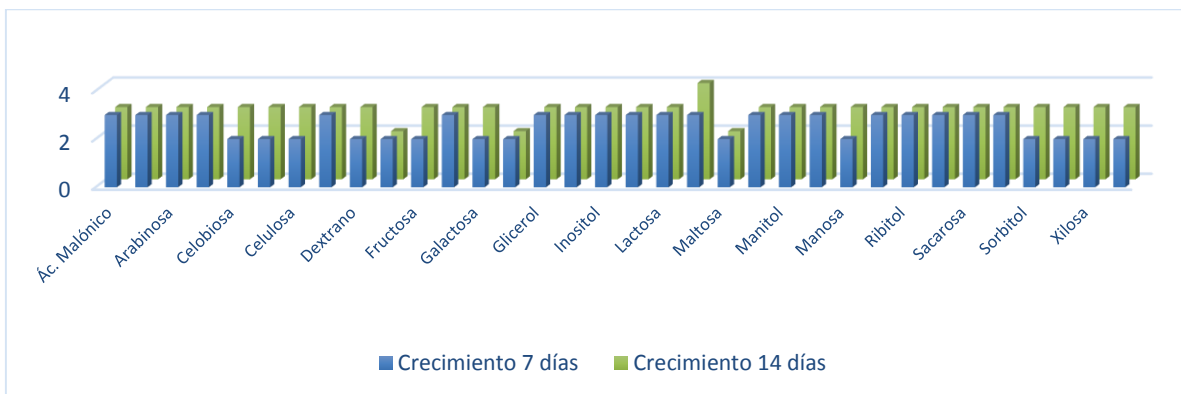


Gráfica 5 Crecimiento en fuentes de carbono (con duplicado), de la cepa I006

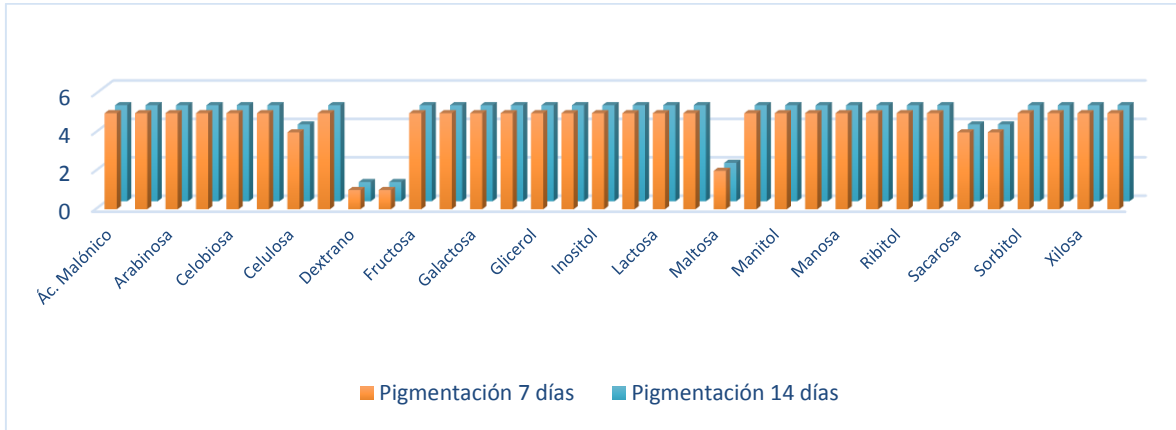


Gráfica 6 Pigmentación en fuentes de carbono (con duplicado), de la cepa I006

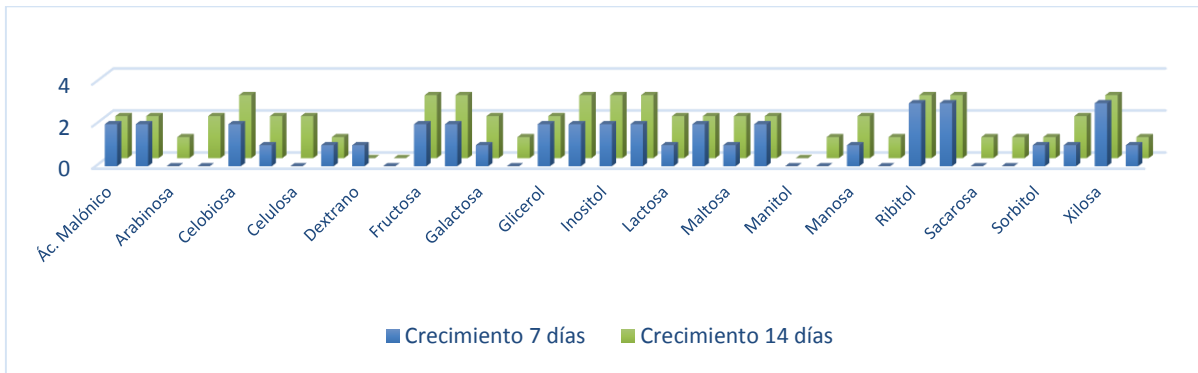
En el aislado I013 utilizando celobiosa, sorbitol y xilosa como únicas fuentes de carbono, se observa claramente en las dos repeticiones como el crecimiento aumenta del día 7 al 14 de incubación, la pigmentación va de beige a naranja. En el aislado I025 se observa que el crecimiento es mayor que la pigmentación (gráfica 9 y 10).



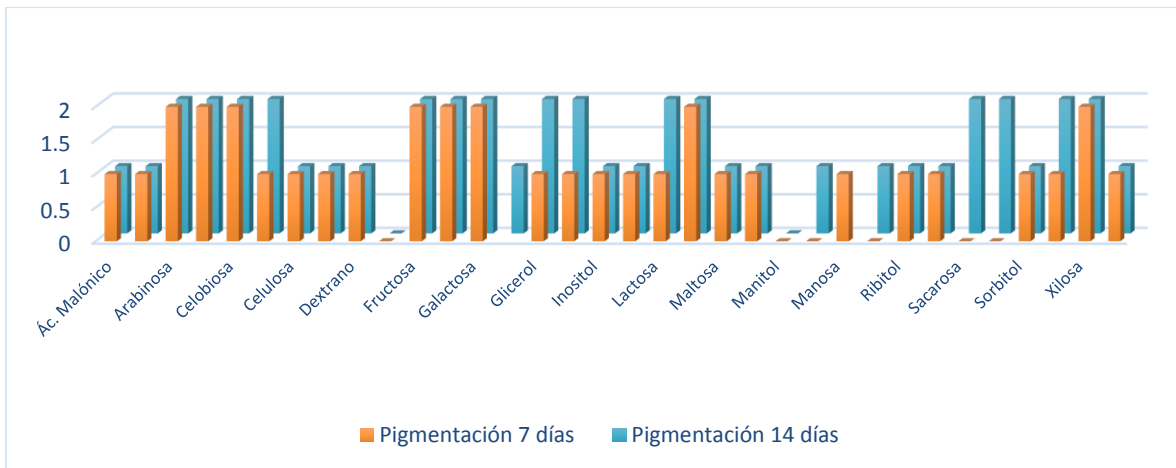
Gráfica 7 Crecimiento en fuentes de carbono (con duplicado), de la cepa I013



Gráfica 8 Pigmentación en fuentes de carbono (con duplicado), de la cepa I013



Gráfica 9 Crecimiento en fuentes de carbono (con duplicado), de la cepa I025



Gráfica 10 Pigmentación en fuentes de carbono (con duplicado), de la cepa I025

El mecanismo de control global que regula la utilización de fuentes de carbono de manera sistemática se denomina represión catabólica por carbono (RCC) (Saier y Reizer, 1992), y se

sabe que si sólo una fuente de carbono está disponible, de cualquier forma, la RCC está presente, lo cual es una consecuencia del metabolismo del carbohidrato que actúa como un dispositivo de autorregulación interna, limitando el consumo del carbohidrato y funcionando como sistema economizador de energía (Forero y Sánchez, 2008).

El buen crecimiento de los microorganismos aislados con ácido malónico puede deberse a que esta fuente aporta núcleos aromáticos a hongos y bacterias. De los tres azúcares evaluados que se obtienen a partir de la ruta metabólica de las pentosas (arabinosa, galactosa y xilosa), se observó que el crecimiento fue bajo, especialmente para I025; se sabe que estos tres azúcares forman parte de la pared celular de plantas, por lo que podría esperarse que estos microorganismos no se encuentren asociados a estructuras vegetales.

El crecimiento bajo con xilosa podría explicarse a la producción limitada de ATP con esta fuente de carbono, pues se sabe que el gasto energético para su uso es alto, si se le compara por ejemplo con la glucosa (Tao *et al.*, 2001; Underwood *et al.*, 2002).

La celulosa fue la fuente de carbono que afectó de manera negativa el crecimiento de los microorganismos, así como la producción de pigmentos, esto quizá se deba a que esta fuente es un biopolímero que para su degradación requiere de celulasas que los aislados no son capaces de producir; sin embargo se encontró que el crecimiento con celobiosa como única fuente de carbono para los aislados I001 e I006 es favorable, por lo que aunque la celobiosa sea un derivado de la celulosa, ésta ya sufrió un proceso de hidrólisis generado un compuesto que es más fácil de asimilar por estos microorganismos; caso contrario sucede con el resto de los evaluados, que tienen poco crecimiento tanto con la celulosa como con la celobiosa.

El nulo o bajo crecimiento que se observó con dextrano como fuente de carbono, puede atribuirse a las propiedades mismas de este polisacárido, las ramificaciones de su estructura podrían explicar su poca asimilación, aunado a esto también se debe considerar que dextrano es altamente soluble en agua y fácilmente filtrable, por lo que teniendo microorganismos con una pared celular con alta concentración en ácidos grasos su aprovechamiento era de esperarse bajo. Caso contrario a la anterior fuente de carbono el crecimiento con glicerol fue alto; sólo I002 creció hasta la segunda semana, pero según estudios realizados, se puede afirmar que los microorganismos que tienen la capacidad de utilizar el glicerol como fuente

de carbono, incorporan los lípidos (aceites) a su estructura (Li *et al.*, 2008), esto puede explicar el buen crecimiento en glicerol, pues se sabe que las bacterias estudiadas poseen una consistencia mantecosa (butirosa).

Resulta interesante observar el mismo comportamiento en la asimilación de manosa y manitol, pues se sabe que este poli- alcohol se obtiene a partir de la reducción de la manosa (hexosa), también se observa una buena asimilación de otro poli-alcohol (sorbitol), por lo que se podría decir que los microorganismos estudiados son buenos oxidantes de alcoholes (Maldonado *et al.*, 2013).

En este punto se sabe que no todas las fuentes de energía tienen el mismo efecto el crecimiento microbiano. En el caso de los azúcares solubles, específicamente hablando de fructosa (monosacárido), los aislados crecen bien y tienen una buena producción de pigmentos; sin embargo comparando otros azúcares solubles sacarosa y lactosa (disacáridos) se determinó que I002 e I025, tienen bajo crecimiento con lactosa y este último es lento con sacarosa; por lo que este es un claro ejemplo que para algunos microorganismos la síntesis y disponibilidad de energía varía de un microorganismo a otro y que esto también depende de la complejidad de la fuente de carbono.

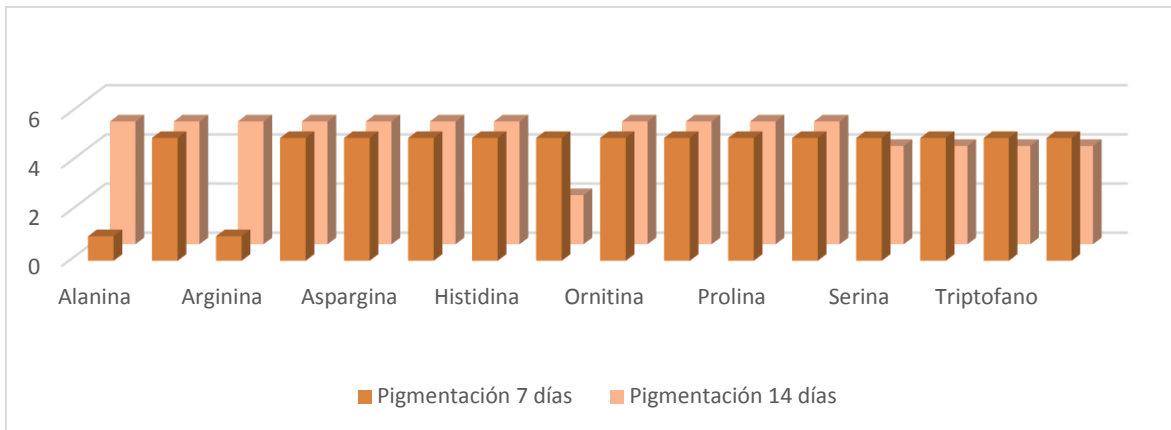
Los resultados permiten distinguir fácilmente que para los cinco aislados las distintas fuentes de carbono empleadas les confieren diversos cambios tanto en crecimiento como en pigmentación. El hecho de que visiblemente se observen cambios en la pigmentación de los aislados, puede deberse a que la producción de carotenoides, es una mezcla dentro de la cual al emplear distintas fuentes de carbono, favorecerán a la producción mayoritaria de un tipo de pigmento carotenoide.

Fuentes de nitrógeno

El medio de cultivo para la evaluación con diferentes fuentes de nitrógeno contiene glucosa como fuente de carbón. En general el aislado I001 tiene un crecimiento medio (2), (gráfica 11 y 12) en la mayoría de las fuentes, aunque con aspargina, prolina y serina existe un aumento de biomasa del día 7 al 14 de evaluación, la pigmentación fue alta aunque en histidina la pigmentación no fue muy intensa y pasó al amarillo.



Gráfica 11 Crecimiento en fuentes de nitrógeno (con duplicado), de cepa I001

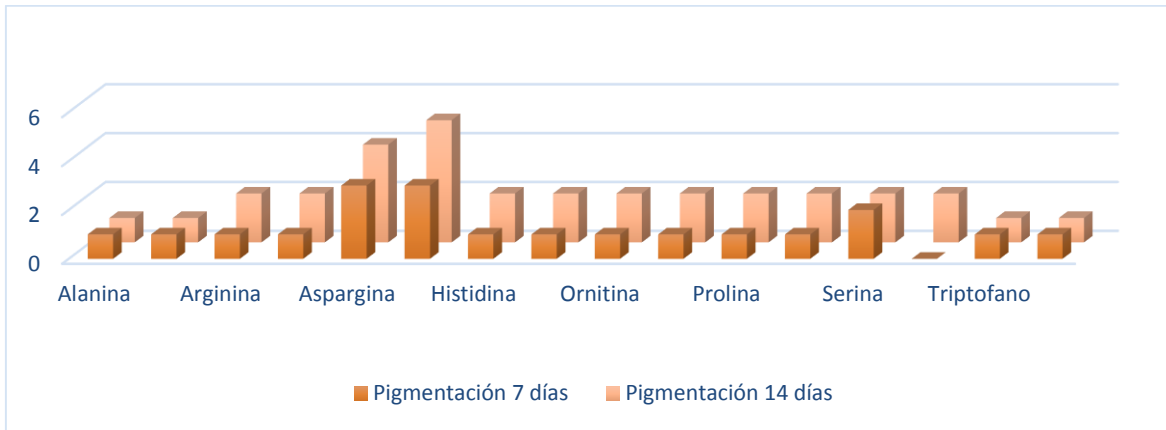


Gráfica 12 Pigmentación en fuentes de nitrógeno (con duplicado), de cepa I001

El aislado I002 (gráfica 13 y 14), tuvo crecimiento similar el día 7 y 14 sólo en triptofano, en el resto de las fuentes hubo aumento de biomasa del día 7 al 14, la pigmentación con aspargina fue de naranja claro a naranja, en el resto de las fuentes la pigmentación fue de beige a amarillo.



Gráfica 13 Crecimiento en fuentes de nitrógeno (con duplicado), de cepa I002



Gráfica 14 Pigmentación en fuentes de nitrógeno (con duplicado), de cepa I002

El aislado I006 (gráfica 15 y 16), tuvo crecimiento constante del día 7 al 14 sólo en alanina, asparagina y ornitina, en el resto de las fuentes la biomasa fue similar en las dos evaluaciones, la pigmentación siempre fue alta, se observó disminución de pigmentación en arginina, ornitina, prolina, serina y triptofano.



Gráfica 15 Crecimiento en fuentes de nitrógeno (con duplicado), de cepa I006

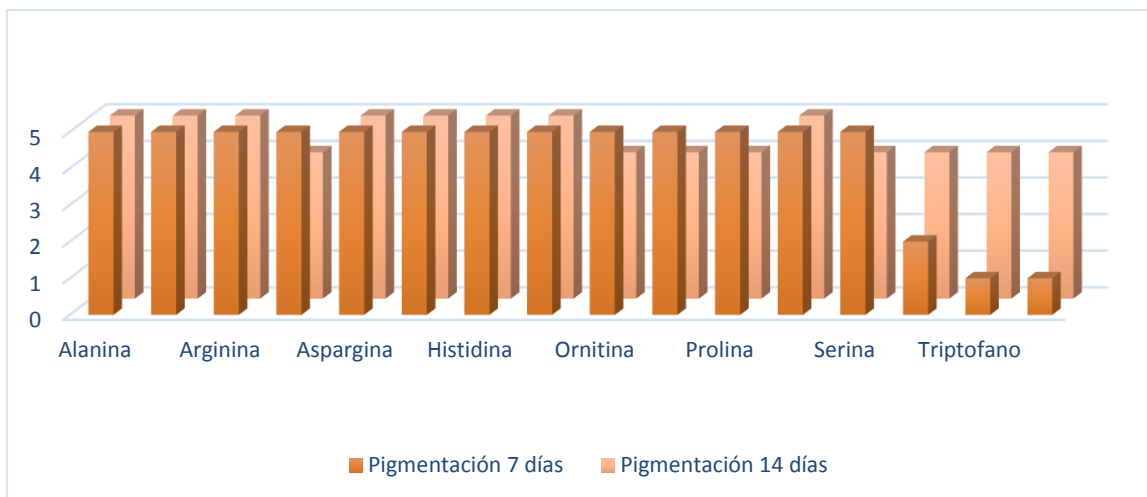


Gráfica 16 Pigmentación en fuentes de nitrógeno (con duplicado), de cepa I006

El aislado I013 (gráfica 17 y 18) en general presenta una pigmentación alta, la biomasa permanece constante en las evaluaciones, aunque si existe aumento en arginina, aspargina y serina.



Gráfica 17 Crecimiento en fuentes de nitrógeno (con duplicado), de cepa I013

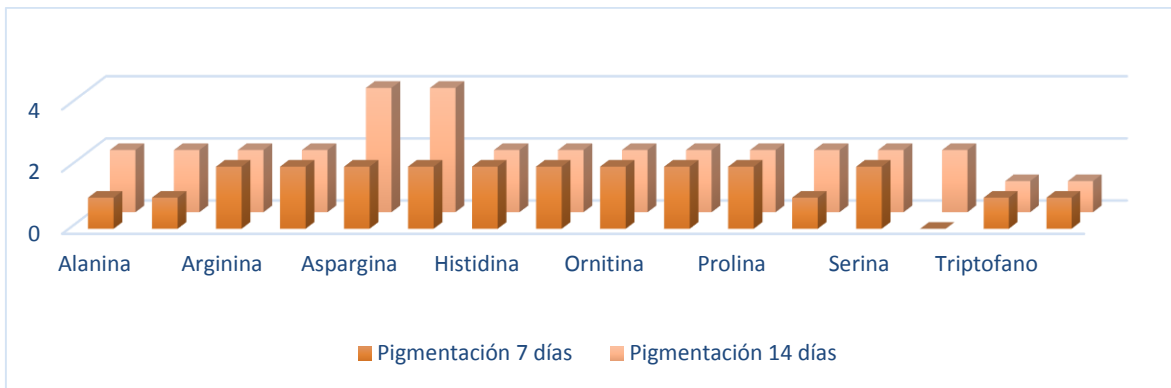


Gráfica 18 Pigmentación en fuentes de nitrógeno (con duplicado), de cepa I013

Se observó pigmentación naranja en I025 (gráfica 20) en aspargina, en el resto de las fuentes fue amarilla, en presencia de aspargina, prolina y triptofano la biomasa (gráfica 19) fue similar tanto el día 7 como el 14; en el resto de las fuentes, se observó que la pigmentación aumenta con respecto a los días de incubación.



Gráfica 19 Crecimiento en fuentes de nitrógeno (con duplicado), de cepa I025



Gráfica 20 Pigmentación en fuentes de nitrógeno (con duplicado), de cepa I025

A excepción de I006, el bajo crecimiento de los aislados con alanina resulta interesante, pues se sabe que este aminoácido después de la glicina es el más simple; además este se encuentra involucrado en la construcción del peptidoglicano que es el principal constituyente de la pared celular, el bajo crecimiento con esta fuente de nitrógeno, coincide con el mismo comportamiento de desarrollo con triptófano, esto se puede deber a que la alanina actúa en el metabolismo del triptofano y a su alto costo para metabolizarlo.

Las bacterias tienen varias estrategias para degradar arginina ya que, dependiendo del organismo y de las condiciones de crecimiento, se puede utilizar la arginina como fuente de nitrógeno y carbono o energía (Charlier y Glansdorff, 2004; Larsen *et al.*, 2005). Se observó que hubo buen crecimiento de los aislados; a excepción de I002 que fue bajo en arginina como fuente de nitrógeno, esto resulta de gran valor, pues estudios previos demuestran que el metabolismo y la regulación de arginina tienen importancia en la virulencia de bacterias como *M. tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, y *M. bovis* (Sasseti *et al.*, 2003; Ryan *et al.*,

2009; Hovel-Miner *et al.*, 2010) por lo que podríamos suponer que si tienen buen crecimiento utilizando arginina, es muy probable que los microorganismos (I001, I006, I013 e I025) sean virulentos.

El buen crecimiento de todos los microorganismos evaluados en asparagina resulta interesante, pues se sabe que su precursor la asparagina, un aminoácido no esencial forma parte de los llamados bacteriocidas no lantibióticos (Montalbán-López *et al.*, 2011).

El bajo crecimiento de todos los microorganismos estudiados con histidina podría deberse a que es uno de los cuatro aminoácidos metabólicamente más caro de sintetizar, junto con fenilalanina (Phe, F), tirosina (Tyr, Y), triptófano (Trp, W) (Alifano *et al.*, 1996; Akashi y Gojobori, 2002; Swire, 2007) lo que coincide con el bajo crecimiento de los aislados con triptófano a excepción de I006.

La ornitina se comienza a sintetizar por la acción de la enzima ornitina descarboxilasa, la cual se ha demostrado que es baja o nula en algunos hongos (Ruiz-Herrera, 1994). Los resultados de este trabajo demostraron que la ornitina también es baja en los microorganismos de estudio; esta enzima es importante porque está presente en el proceso de síntesis de poliaminas, estas moléculas son necesarias para la replicación de ADN, apoptosis, transcripción y traducción (Ruiz-Herrera, 1994; Basu y Marton, 1995).

Los resultados indican que con medios de cultivo económicos pero bien diseñados se pueden evaluar cambios visibles para la producción de pigmentos carotenoides; que en realidad son cambios que nos proporcionan una gran variedad de pigmentos que presentan un amplio rango desde los más tenues como el beige pasando por naranja.

En general al observar los efectos de las diferentes fuentes de nitrógeno y carbono en los aislados evaluados, se puede decir que la producción de biomasa fue menor frente a las fuentes de nitrógeno, pero la pigmentación fue similar con los dos tipos de fuente.

Se comparó el comportamiento de los aislados, frente a cepas conocidas de referencia quimiotaxonómicamente las cepas evaluadas poseen marcadores químicos que apoyan su asignación al género *Rhodococcus*; la pared celular contiene ácido meso-diaminopimélico, arabinosa y galactosa (es decir, la pared celular tipo IV; Lechevalier y Lechevalier, 1970).

En la cromatografía de extracción de ácidos micólicos se identificó un Rf con valor entre 0.40 y 0.48.

Tabla 8 Crecimiento en fuentes de carbono, de los aislados I001, I002, I006, I013 e I025, *Rhodococcus*, *R. corynebacterioides*, *Williamsia*, *W. maris*, *Dietzia* y *D. maris*

	I001	I002	I006	I013	I025	<i>Rhodococcus</i>	<i>R. corynebacterioides</i>	<i>Williamsia</i>	<i>W.maris</i>	<i>Dietzia</i>	<i>D. maris</i>
Ácido malónico	+	+	+	+	+						
Adonitol	+	+	+	+	+	-	+		-	-	-
Arabinosa	+	+	+	+	W	+	+	-	-	-	-
Celobiosa	+	+	+	W	W	-	-	-	-	-	-
Celulosa	+	+	+	+	+						
Dextrano	+	-	+	+	-						
Fructosa	+	+	+	+	+	+	+				
Galactosa	+	+	+	+	W	+	+		+	-	-
Glicerol	+	W	+	+	+						
Inositol	+	+	+	+	+	+	+		+	-	-
Lactosa	+	+	+	+	+		-	-	-	-	-
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+		+		-
Manitol	+	+	+	+	W	-	+/-	+	+		-
Manosa	+	+	+	+	+	-	+				
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
Sacarosa	+	+	+	+	W		+				+
Xilosa	+	+	+	+	+	-	+	+	+	W	W

+ Crecimiento, - Sin crecimiento, +* Bajo crecimiento, W crecimiento hasta la segunda semana. (Kämpfer *et al.*, 2013; Yassin y Hupfer, 2006 y Yassin *et al.*, 2006). El espacio en blanco indica que no se evaluaron esas fuentes de carbono.

Las cepas evaluadas tienen crecimiento similar a *R. corynebacterioides*, frente a las mismas fuentes de carbono; aunque *R. corynebacterioides* no crece en celobiosa, se observó que I002 tuvo poco crecimiento y los aislados I013 e I025 crecieron hasta la segunda semana.

Tabla 9 Crecimiento en fuentes de nitrógeno, de los aislados I001, I002, I006, I013 e I025, *Rhodococcus*, *R. corynebacterioides*, *Williamsia*, *W. maris*, *Dietzia* y *D. maris*

	I001	I002	I006	I013	I025	<i>Rhodococcus</i>	<i>R. corynebacterioides</i>	<i>Williamsia</i>	<i>W.maris</i>	<i>Dietzia</i>	<i>D. maris</i>
Alanina	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
Arginina	+	+	+	+	+		-				
Aspargina	+	+	+	+	+	-	+				
Histidina	+	+	+	+	+	-	-				
Ornitina	+	+	+	+	+	-	+/-	-	-	-	-
Prolina	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
Serina	+	W	+	+	W	-	+	-	-	-	-
Triptofano	+	+	+	+	+	-	-				

+ Crecimiento, - Sin crecimiento, +* Bajo crecimiento, W crecimiento hasta la segunda semana. (Kämpfer *et al.*, 2013; Yassin y Hupfer, 2006 y Yassin *et al.*, 2006). El espacio en blanco indica que no se evaluaron esas fuentes de nitrógeno.

Por lo observado en cuanto al crecimiento de los aislados en las diferentes fuentes de nitrógeno, se podría deducir que las cepas corresponden a *R. corynebacteroides*, aunque los miembros de esta especie no crecen en presencia de alanina, histidina y triptofano se observó que los microorganismos de estudio con estas tres fuentes e nitrógeno fue bajo.

Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Yassin y Schaal (2005) quienes encontraron que el perfil taxonómico de *R. corynebacterioides* corresponde a colonias suaves, pigmentadas naranjas a rojo, las células son en forma de varilla y cocoides, gram positivas y ácido-alcohol resistentes, de crecimiento lento; asimila adonitol, arabinosa, 2,3-butanodiol, citrato, etilo, fructuosa, galactosa, glucosa, gluconato, inositol, maltosa, manitol, manosa, 1,2-propanodiol, sacarosa, sorbitol, sucrosa y trehalosa como fuentes de carbón; pero no adipato, alcohol isoamílico, celobiosa, lactosa, rafinosa o ramnosa. La xilosa es débilmente utilizada como fuente de carbono. Utiliza aspargina, prolina, serina y ornitina, pero no acetamida, alanina, arginina, histidina y triptófano como fuentes de nitrógeno.

El potencial catabólico de las especies *gordoniae*, *nocardiae*, *rodococco* y *tsukamurellae*, y probablemente *dietziae* y *skermaniaes* no sólo incluye la capacidad de asimilar los hidratos de carbono y proteínas, sino también compuestos como hidrocarburos alifáticos, anilina, hidrocarburos bicíclicos y policíclicos, compuestos nitroaromáticos, piridina y esteroides (Tárnok, 1976; Cain, 1981; Janke *et al.*, 1986; Van Ginkel *et al.*, 1987; Peczynska-Czoch y Mordarski, 1988; Williams *et al.*, 1989). Detergentes y plaguicidas, incluyendo la warfarina, también son modificados (Goodfellow y Williams, 1983). La capacidad de sintetizar lípidos complejos (Minnikin, 1982; Ioneda, 1988), incluyendo ácidos micólicos, distingue a *dietziae*, *gordoniae*, *nocardias*, *rhodococco*, *skermaniae* y *tsukamurellae* de todas las otras bacterias aparte de corinebacterias y micobacterias (Goodfellow y Maldonado 2006).

Los miembros del género *Dietzia*, *Gordonia*, *Rhodococcus* y *Tsukamurella* se han aislado de hábitats acuáticos y terrestres, así como a partir de material clínico, y son difíciles de distinguir unos de otros utilizando propiedades fenotípicas simples (Goodfellow y Maldonado, 2006). La morfología y el aspecto clínico de las cepas del género *Dietzia*, por ejemplo, son muy similares a los de *Rhodococcus equi*, un organismo frecuentemente encontrado por los microbiólogos médicos en su práctica diaria; por lo que podría parecer

que probable las infecciones causadas por la especie *dietziae* podría haber sido identificada erróneamente como *Rhodococcus sp.* (Koerner *et al.*, 2009).

Filogenia

Se analizaron las secuencias del gen 16S de cada uno de los aislados (I001, 1002, 1006, 1013 e I025; I001 16S; I002 16S; 1006 16S; 1013 16S e I025 16S), y se compararon con aquellas depositadas en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). La construcción del árbol filogenético para la validación taxonómica se realizó con el programa MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2015), a partir del método de Máxima Verosimilitud (ML), las distancias evolutivas se calcularon usando el modelo de evolución de Hasegawa Kishino Yano+G (Hasegawa *et al.*, 1985) que mostró ser el de mayor ajuste para las secuencias. El análisis se realizó con representantes de géneros que contienen ácidos micólicos; cabe decir que esta selección de microorganismos con ácidos micólicos se hizo a partir de la extracción de estos y a partir del BLAST.

En la figura 8, se observa que los aislados que comparten código de inicio, por ejemplo (I006 e I006 16S), son exactamente el mismo aislado, pero el método de obtención de los nucleótidos a partir del 16S es distinto, (pues recordemos que las secuencias provenientes de los aislados de I001 a I025 se obtuvieron a partir de cebadores específicos para la clase actino; y para las secuencias con terminación 16S se obtuvieron a partir de cebadores universales 16S) el acoplamiento a los nodos no se comportó como se hubiera esperado por esta homología; aquí I06, filogenéticamente se encuentra más relacionado a *R. equi*, mientras que I013, I01 16S e I01, son más cercanos al género *Dietzia* y a sus especies, sin embargo se observa que I006 16S e I013 16S, se agrupan en un clado separado; y con más relación filogenética con *E. sp.*, *M. smegmatis* y *R. jostii*. Este comportamiento podría estar sustentado en la suposición que las copias de genes de rARN dentro de un organismo están sujetos a la homogeneización a través de la conversión de genes (Hashimoto *et al.*, 2003).

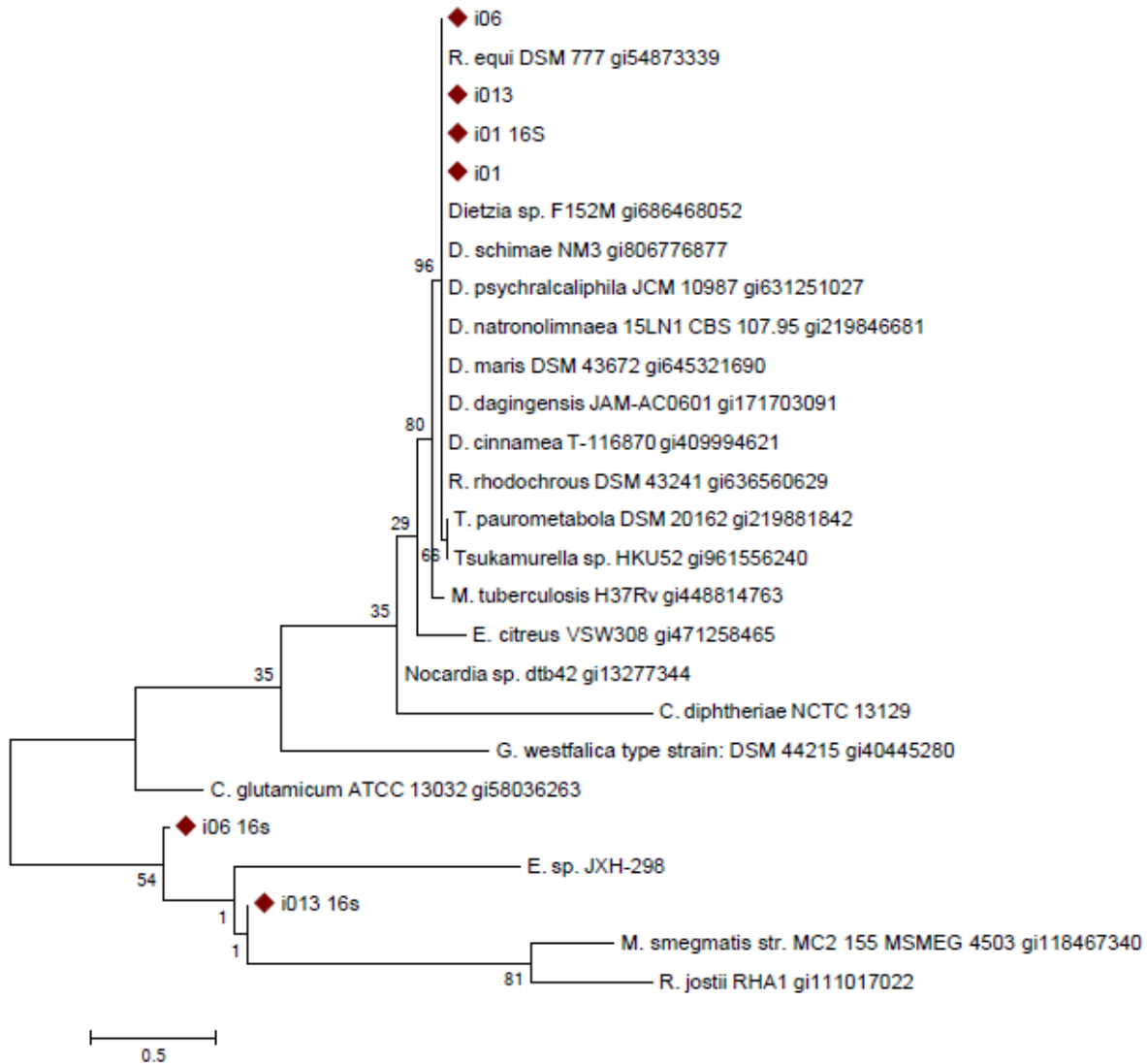


Figura 8 Árbol filogenético, empleando el método estadístico Máxima Verosimilitud (ML) basado en el modelo de evolución de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY+G), (Hasegawa *et al.*, 1985) y la prueba de filogenia Bootstrap. Se utilizaron las secuencias de microorganismos con ácidos micólicos.

Lo anterior también se complementa con lo determinado por Pei *et al* (2010) quienes determinaron que existen secuencias 16S de la misma especie, o incluso el mismo genoma que son a menudo diferentes; y que las especies bacterianas con secuencias que difieren en > 1% son bastante comunes. En las bacterias termófilas es donde más variaciones 16S rARN se han encontrado; por lo que se ha propuesto que la transferencia horizontal de genes es la causa potencial de estas variaciones (Acinas *et al.*, 2004).

Vetrovsky y Baldrian (2013) encontraron que aun teniendo niveles de similitud altos (97%) el 9.3% de sus aislados de estudio contenían secuencias de múltiples géneros; muestran que

esta similitud interespecífica o intergenéricos puede afectar significativamente la construcción OTU's (Unidad operacional taxonómica); pues en algunos géneros las especies tenían exactamente la misma secuencia de 16S rARN.

De acuerdo a la filogenia I013, I01 16S e I01 pertenecen al género *Dietzia*, el cuál en un principio era identificado como *Flavobacterium maris* (Harrison, 1929), pero posteriormente se le conoció como *Rhodococcus maris* (Nesterenko *et al.*, 1982), por poseer características que hacían pensar en su asignación al género *Rhodococcus*, por lo que al haber supuesto que los microorganismos estudiados pertenecían a este género es un poco normal, puesto que las características de crecimiento y asimilación de ciertos nutrientes así lo indicaba. Hoy en día el género *Dietzia* se compone de tres especies *D. maris*, *D. natronolimnaios* y *D. psychralcaliphilus*, que forman un clado en el árbol de genes 16S rARN *Corynebacterineae*.

Existen reportes (Nesterenko *et al.*, 1982; Rainey *et al.*, 1995a; Colquhoun *et al.*, 1998) de haber hallado cepas de *D. maris* en suelo, piel y tracto intestinal de la carpa, así como en sedimentos de aguas profundas en el Océano Pacífico, pero no existen reportes de haber aislado este género en aguas del Golfo de México, por lo que podríamos estar frente a un género no antes reportado dentro de este ambiente.

Se sabe que este género llega a afectar la salud del ser humano, la primera evidencia documentada fue de un paciente inmunocomprometido (Bemer-Melchior *et al.*, 1999); este microorganismo también se ha aislado de infecciones en los huesos (Pidoux *et al.*, 2001).

Otra de las relaciones filogenéticas fuertes que podemos observar es la de los aislados I001, con *D. schimae*; este género recientemente se ha descrito, junto con *D. cercidiphylli*, las cuales han sido aisladas a partir de tejido vegetal de una superficie esterilizada (Li *et al.*, 2008).

Entre los nuevos géneros de *Dietzia* que se han encontrado se tiene a *D. dagingensis*, aislada a partir de una muestra de agua proveniente de la planta petrolera Dagenging en China (Nazina *et al.*, sin publicar), y *D. timorensis*, aislada a partir de una muestra de suelo, en Indonesia (Yamamura *et al.*, 2010). Sin embargo se necesitan más estudios para determinar

el estatus taxonómico de *D. dazingensis*, pues tiene una secuencia de genes 16S rARN idéntica a la cepa *D. natronolimnaea*.

El mismo comportamiento se observa en la figura 9, con los aislados I002 e I025; I02 se relaciona filogenéticamente con *E. longus*; mientras que *E. citreus* se relaciona con I025; pero también se aprecia que tanto I02 16S e I025 16S se encuentran en un clado distinto y su aproximación filogenética es más cercana a *E. citreus*.

Este género fue propuesto por Shiba y Simidu (1982), son bacterias gram-negativas, ovoides, aeróbicos y en algunos casos quimioorganótrofos. Las especies de este género son de color rojo o naranja, en su coloración contienen bacterioclorofila-a y carotenoides (Shiba y Simidu, 1982; Yurkov *et al.*, 1994). En 2002 se describió a *Erythrobacter citreus*, una especie con pigmentación amarilla, que carece de bacterioclorofila-a (Denner *et al.*, 2002). Los análisis filogenético basado en secuencias 16S rARN han demostrado que el género *Erythrobacter* cae dentro de la α -subclase de las proteobacterias y está estrechamente relacionada con los géneros *Erythromicrobium* y *Porphyrobacter* (Yurkov *et al.*, 1994; Anzai *et al.*, 2000; Denner *et al.*, 2002).

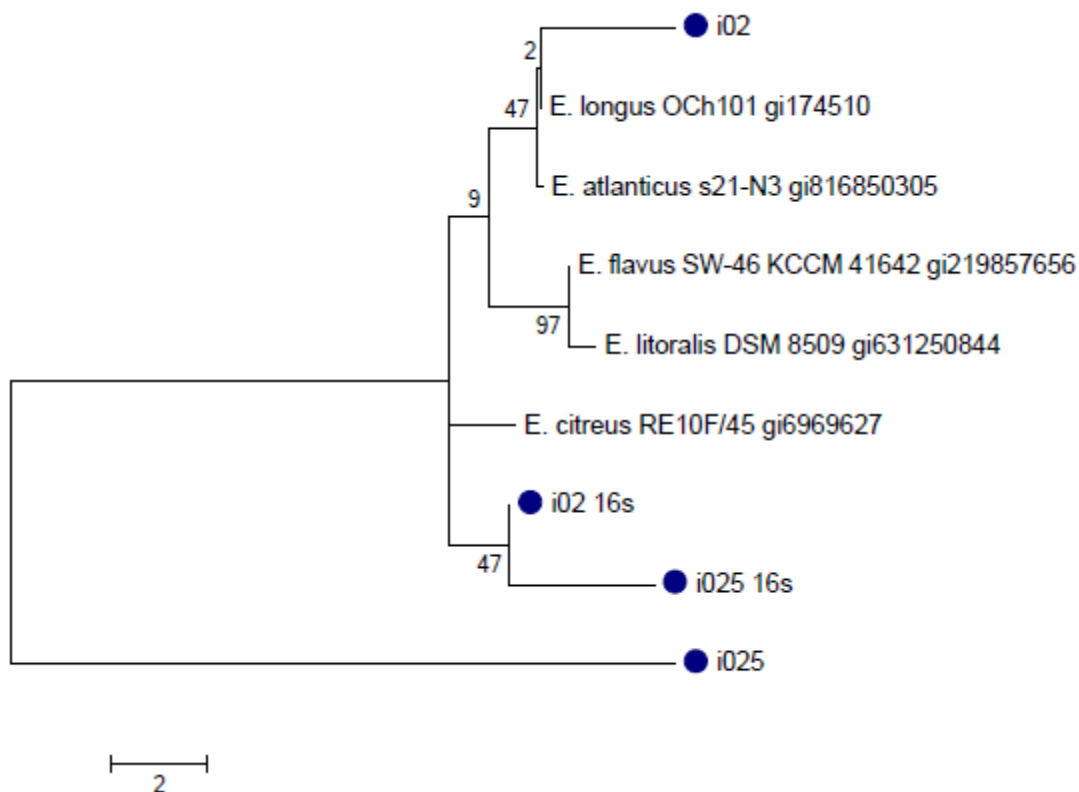


Figura 9 Árbol filogenético, de los aislados i02 e i025 y algunos miembros del género *Erythrobacter*; empleando el modelo de evolución de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY+G), (Hasegawa *et al.*, 1985) y la prueba de filogenia Bootstrap.

Existen investigaciones que sugieren que una combinación de características morfológicas y quimiotaxonómicas se puede utilizar para distinguir *Dietzia* de otros géneros que contienen ácidos micólicos (Koerner *et al.*, 2009), sin embargo en esta investigación se comprobó que esto no fue posible, debido a la dificultad que resultó clasificar correctamente a los microorganismos estudiados según su género con estas características, como: coloración, consistencia, crecimiento lento o rápido, tipo de pared celular, contenido de ácido micólicos y asimilación de nutrientes; pero se comprobó que es necesaria la implementación de métodos genéticos para una identificación adecuada; esto también concuerda con lo encontrado por Kleinsteuber *et al.*, (2006); Sette *et al.*, (2007); Tiago *et al.*, (2004) y Brito *et al.*, (2006) que cuentan con cepas de *Dietzia* aisladas en aguas subterráneas, manglares y yacimientos petroleros pero no las han podido caracterizar; también se tienen reportes de la evidencia en donde con la utilización de pruebas de carbono (Biotype- 100 tiras) se puede llegar a diferenciar e identificar, miembros de los géneros *Dietzia*, *Gordonia* y *Rhodococcus*

(Bizet *et al.*, 1997), sin embargo con la evaluación que se llevó a cabo utilizando diferentes fuentes de carbono y nitrógeno esta identificación a nivel género no se pudo llevar a cabo correctamente, estos resultados coinciden con los reportados por Koerner *et al.*, (2009) quienes encontraron que con la utilización de un equipo comercial (API CORYNE versión 3.0) se obtiene un perfil de identificación, del 98.1% como *Rhodococcus sp.*, siendo géneros de *Dietzia* los realmente analizados.

Es importante señalar que hoy en día no se debe considerar como única opción, hacer una identificación de cualquier microorganismo sólo con la implementación de métodos tradicionales, se debe hacer uso de herramientas moleculares, específicamente se sabe que las bacterias constantemente van creando resistencia a su entorno, y esto conlleva adaptaciones que pueden dar características fenotípicas que podrían ser confusas para su identificación e manera tradicional, en el presente trabajo se pone en evidencia que dos microorganismos estudiados presentaban características de actinobacterias, específicamente pertenecientes a la familia *Corynebacteriaceae*, sin embargo gracias a las pruebas moleculares se pudo concluir que tanto I002 como I025 pertenecen a la familia *Erythrobacteraceae*.

Conclusiones

La necesidad de utilizar herramientas moleculares para complementar la caracterización y explorar las diversas actividades metabólicas de los miembros de las familias *Dietziaceae*, *Gordoniaceae*, *Nocardiaceae* y *Tsukamurella* cada vez más evidente.

La importancia de esta investigación, radica en el aporte del conocimiento a la diversidad genética de actinomicetos provenientes de sedimentos del Golfo de México, una de las principales aportaciones fue el hallazgo de especies del género *Dietzia*, pues se sabe que esta puede estar implicada en la degradación de petróleo crudo, la presencia de estas especies nos indica que estamos frente a microorganismos no reportados con anterioridad en este ambiente, es importante señalar la amplia diversidad de actinomicetos presentes en ambientes marinos y dejar de reconocer a los géneros *Micromonospora*, *Rhodococcus* y *Streptomyces*, como los más representativos; en términos de la importancia biotecnológica de la presente recordemos que algunos de estos actinomicetos producen metabolitos secundarios, a partir

de los cuáles podemos obtener agentes terapéuticos, además del posible uso como biocolorante que se puede dar a partir de los pigmentos carotenoides, pero para esto es necesario ampliar los estudios y utilizar técnicas analíticas para contabilizar los pigmentos.

Perspectivas

- Es necesario implementar métodos analíticos, para cuantificar la producción de pigmentos carotenoides.
- Se considera oportuno que la selección de cebadores para la PCR, se realice con aquellos que recientemente hayan mostrado mejor afinidad para la replicación.
- Es recomendable evaluar los aislados obtenidos frente a especies antagonistas, además de estudiar el potencial de los aislados para degradar compuestos xenobióticos.

Literatura

Acinas, S.G., Marcelino, L.A., Klepac-Ceraj, V. y Polz, M.F. (2004). Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *Journal of Bacteriology*, 186, 2629-2635.

Akashi H. y Gojobori T. (2002). Metabolic efficiency and amino acid composition in the proteomes of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 3695-3700.

Alifano P., Fani R., Liò P., Lazcano A., Bazzicalupo M., Carlomagno M.S. y Bruni C.B. (1996). Histidine biosynthetic pathway and genes: structure, regulation, and evolution. *Microbiological Reviews*, 60, 44-69.

Anzai, Y., Kim, H., Park, J.Y., Wakabayashi, H. y Oyaizu, H. (2000). Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 1563-1589.

Baba, T., Nichiuchi, Y., y Yano, I. (1997). Composition of mycolic acid molecular species as a criterion in nocardial classification. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 795-801.

Barbier, G. D., y Prieur, D. (1991). Une Nouvelle filiare: Les microorganismes marins. *Biofutur*, 106, 41-46.

Barragán, T.L. (2009). *Efecto de diversas fuentes de carbono y nitrógeno en la producción de pigmentos carotenoides en microorganismos aislados en el Golfo de México*. Tesis de maestría. Facultad de Química. México. D.F.

Basu, H.S. y Marton, L.J. (1995). Biological and therapeutic implications of the effects of polyamines on chromatin condensation. En Casero, R.A. Jr. (Ed.), *Polyamines: regulation and molecular interaction* (pp. 101-128). Austin, USA: RG Landes Company,

Bemer-Melchior, P., Haloun, A., Riegel, P. y Drugeon, H. (1999). Bacteremia due to *Dietzia maris* in an immunocompromised patient. *Clinical Infectious Diseases*, 29, 1338-1340.

Bérdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites: a personal view. *Journal of Antibiotics*, 58, 1-26.

Bizet, C., Barreau, C., Harmant, C., Nowakowski, M. y Pietfroid, A. (1997). Identification of *Rhodococcus*, *Gordonia* and *Dietzia* species using carbon source utilization tests ("Biotype-1002" strips). *Research in Microbiology*, 148, 799-809.

Briggs, J. C. (1994). Species diversity: land and sea. *Systematic Biology*, 43, 130-135.

Brito, E.M., Guyoneaud, R., Goni-Urriza, M., Ranchou-Peyruse, A., Verbaere, A., Crapez, M.A., Wasserman, J.C. y Duran, R. (2006). Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. *Research in Microbiology*, 157, 752-762.

Brown-Elliott, B.A., Brown, J.M., Conville, P.S. y Wallace, R.J. Jr. (2006). Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(2), 259-82.

Bueno, L., Castaño L.M., Hernández, D., Peña, K., Ordoñez, C.A., Rodríguez, J.R., y Salazar, A.M. (2012). *Clasificación de actinomicetos aislados del suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira para usos en biorremediación*. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.

Bull, A., Ward, A.C., Goodfellow, M. (2000). Search and discovery strategies for biotechnology: The paradigm shift. *Microbiology Molecular Biology Review*, 64, 573-606.

Cain, R.B. (1981). Regulation of aromatic and hydroaromatic catabolic pathways in nocardioform actinomycetes. *Zentralblatt für Bakteriologie, Supplement, 11*, 335-354.

Carro, L., Spröer, C. Alonso, P., y Trujillo, M.E. (2012). Diversity of Micromonospora strains isolated from nitrogen fixing nodules and rhizosphere of Pisum sativum analyzed by multilocus sequence analysis. *Systematic and Applied Microbiology, 35*, 73-80.

Carroll, N.M., Jaeger, E.M., Choudhury, S., Dunlop, A.S., Matheson, M., Adamson, P., Okhravi, N. y Lightman, S. (2000). Detection of and discrimination between gram-positive and gram-negative bacteria in intraocular samples by using nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology, 5(38)*, 1753-1757.

Cirillo, J.D., Weisbrod, T.R., Banerjee, A., Bloom, B.R. y Jacobs, W.R. (1994). Genetic determination of the meso-diaminopimelate biosynthetic pathway of mycobacteria. *Journal of Bacteriology, 176(14)*, 4424-4429.

Colquhoun, J.A., Mexson, J., Goodfellow, M., Ward, A.C., Horikoshi, K. y Bull, A.T. (1998). Novel rhodococci and other mycolate actinomycetes from the deep sea. *Antonie van Leeuwenhoek, 74*, 27-40.

Cragg, G.M., y Newman, D.J. (2001). Medicinals for the millennia. The historical record. *Annals of the New York Academy of Sciences, 953*, 3-25.

Cross, T. (1981). Aquatic Actinomycetes: A critical survey of the occurrence, growth and role of Actinomycetes in aquatic habitats. *Journal of Applied Bacteriology, 50*, 397-423.

Denner, E.B.M., Vybiral, D., Koblížek, M., Kämpfer, P., Busse, H.J. y Velimirov, B. (2002). *Erythrobacter citreus* sp. nov., a yellowpigmented bacterium that lacks bacteriochlorophyll a, isolated from the western Mediterranean Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52*, 1655-1661.

Ezziyyani, M., Pérez, C., y Requena, M. (2004). Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. *Anales de Biología*, 26, 61-68.

Fenical, W. (1993). Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. *Chemical Reviews*, 93, 1673-83.

Forbes, B.A. (2009). Papel del microscopio. En Forbes, B.A. (Ed.), *Diagnóstico microbiológico* (pp.83-85, 311-322) Editorial Panamericana.

Forero, A. y Sánchez, S. (2008). Represión catabólica por carbono de bacterias gram-positivas: Inteligencia alimenticia. *BioTecnología*, 12(2), 24-48.

Fortman, J.L., Magarvey, N.A., y Sherman, D.H. (2005). Something old, something new: ongoing studies of marine actinomycetes. *Proceedings SIM*. Abstract S86.

Franco-Correa, M. (1999). *Aislamiento, Caracterización y Evaluación de Actinomycetes inhibidores de algunos hongos fitopatógenos*. Tesis de maestría, Departamento de Química, Instituto de biotecnología, Universidad Nacional de Colombia.

Franco-Correa, M. (2009). Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización. *Revista Peruana de Biología*, 16 (2), 239-242.

Goodfellow, M. y Williams, S.T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*, 37, 189-216.

Goodfellow, M., y Cruz, T. (1984). Clasificación. En Goodfellow, M., Mordarski, M. y Williams, S.T. (Eds.), *La Biología de la actinomicetos* (pp. 7-164). Londres: Academic Press.

Goodfellow, M. y Haynes, J.A. (1984). *Biological, Biochemical, and Biomedical Aspects of Actinomycetes*. New York: Academic Press (pp. 453-47).

Goodfellow, M. (1992). The family Nocardiaceae. En Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. Schleifer, K.H. (Eds.), *The Prokaryotes* 2nd ed. (pp. 1188-1213). New York: Springer.

Goodfellow, M. y Maldonado, L.A. (2006). The families *Dietziaceae*, *Gordoniaceae*, *Nocardiaceae* and *Tsukamurellaceae*. En Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H. Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes. A handbook on the Biology of Archaea and Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*. 3ra ed. (pp 843-888). New York: Springer.

Goodfellow, M., y Fiedler, H.P. (2010). A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98, 119-142.

Goodfellow, M., Stach, J.E., Brown, R., Venkata, B.A.N., Jones, A.L., Mexson, J. Fiedler, H.P., Zucchi, T.D., y Bull, A.T. (2012). *Verrucosispora maris* sp. nov., a novel deep sea actynomicete isolated form a marine sediment which produces abyssomicins. *Antonie van Leeuwenhoek*. 101,185-193.

Groombridge, B., y Jenkins, M.D. (2002). *World atlas of Biodiversity: Earth's living resources in the 21st Century*. Berkeley, California: University of California.

Harrison, F.C. (1929). The discoloration of halibut. *Canadian Journal of Research*, 1, 214-239.

Hasegawa, M., Kishino, H. y Yano, T. (1985). Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22, 160-174.

Hashimoto, J.Q., Stevenson, B.S. y Schmidt, T.M. (2003). Rates and consequences of recombination between rRNA operons. *Journal of Bacteriology*, 185, 966-972.

Hentschel, U., Schmid, M., Wagner, M., Fieseler, L., Gernert, C., y Hacker, J. (2001). Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the

Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiology Ecology*. 35, 305-12.

Huc, E., Meniche, X., Benz, R., Bayan, N., Ghazi, A., Tropis, M., y Daffé M. (2010). O-mycoloylated proteins from *Corynebacterium*: an unprecedented post-translational modification in bacteria. *Journal Biological Chemistry*, 285, 21908-21912.

Ionedá, T. (1988). Biochemical and physiological aspects of mycolic acids and mycolyl derivatives. En Okami, Y., Beppu, T. y Ogawara, H. (Eds.), *Biology of Actinomycetes* (pp. 463-468). Tokyo, Japan: Japan Scientific Societies Press.

Janke, D., Schukat, B. y Prauser, H. (1986). Screening among nocardioform bacteria strains able to degrade aniline and monochloranilines. *Journal of Basic Microbiology*, 6, 341-350.

Jensen, P.R., y Fenical, W. (1994). Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: Ecological perspectives. *Annual Review Microbiology*, 48, 559-84.

Jiang, C.L., y Xu, L.H. (1996). Diversity of aquatic Actinomycetes in lakes of the middle plateau, Yunnan, China. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 249-53.

Kämpfer P. (2006). The Family Streptomycetaceae, Parte I: Taxonomy. En Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H. y Stackebrandt, E. (Eds.), *The prokaryotes. A handbook on the Biology of Archaea and Bacteria*. 3ra ed. (pp 538-604). New York: Springer.

Kämpfer, P., Andersson, M.A., Rainey, F.A., Kroppensted, R.M., y Salkinoja-Salonen, M. (1999). *Williamsia muralis* gen. nov., sp. nov., isolated from the indoor environment of a children's day care centre. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 681-687.

Kämpfer P., Wellner, S., Lohse, K., Lodders, N., y Martin, K. (2013). *Rhodococcus cerastii* sp. nov. and *Rhodococcus trifolii* sp. nov., two novel species isolated from leaf surfaces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 1024-1029.

Kennish, J.M. (2001). *Practical Handbook of Marine Sciences*. New Jersey, USA: CRR Press.

Kim, B. S., Lonsdale, J., Seong, C-N., y Goodfellow, M. (2003). *Streptacidiphilus* gen. nov., acidophilic actinomycetes with wall chemotype I and emendation of the family *Streptomycetaceae* (Waksman and Henrici (1943) AL) emend. Rainey *et al.*, 1997. *Antonie van Leeuwenhoek*, 83, 107-116.

Kirby, B.M., y Meyers, P.R. (2010). *Micromonospora tulbaghia* sp. nov., isolated from the leaves of wild garlic, *Tulbaghia violacea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 1328-1333.

Kleinstüber, S., Riss, V. y Fetzer, I. (2006). Population dynamics within a microbial consortium during growth on diesel fuel in saline environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 3531-3542.

Koch, C., Kroppenstedt, R.M., Rainey, F.A., y Stackebrandt, E. (1996b). 16S Ribosomal DNA analysis of the genera *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Catellatospora*, *Catenuloplanes*, *Couchioplanes*, *Dactylosporangiurn*, and *Pilimelia* and emendation of the family *Micromonosporaceae*. *International Journal Systematic Bacteriology*. 46, 765-768.

Koerner, R.J., Goodfellow, M. y Jones A.L. (2009). Minireview the genus *Dietzia*: a new home for some known and emerging opportunist pathogens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 55, 296-305.

Koneman, E.W. (2001). *Diagnóstico Microbiológico*. Texto y Atlas a Color. Quinta Edición. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.

Kwon, C.H., Kauffman, A.C., Jensen, R.P. y Fenical, W. (2006). Marinomycins A-D, antitumor-antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus "Marinispora". *Journal of the American Chemical Society*, 128, 1622-1632.

Lacey, J. (1973). *Actinomycetes in soil, compost and fodders in Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance*. Sykes, G. y Skinner, F.A. (Eds.) London: Academic Press.

Lane, D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. En Stackebrandt, E. y Goodfellow, M. (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (pp. 115-175) Chichester, England.

Lechevalier, M.P., y Lechevalier, H. (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 20, 435-443.

Leiva, S., García-Quintana, H.G., y Zaror, L. (2000). Actinomycetes acuáticos: una revisión sobre su aislamiento, distribución y potencial antibiótico. *Medio Ambiente*, 13, 80-8.

Leiva, S., Yáñez, M., Zaror, L., Rodríguez, H., y García-Quintana, H. (2004). Actividad antimicrobiana de actinomycetes aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. *Revista Médica de Chile*, 132, 151-159.

Li, J., Zhao, G.Z., Zhang, Y.Q., Klenk, H.P., Pukall, R., Qin, S. Xu, L.H. y Li, W.J. (2008). *Dietzia schimae* sp. nov. and *Dietzia cercidiphylli* sp. nov., from surface-sterilized plant tissues. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 2549-2554.

Magarvey, N.A., Keller, L., Bernan, V., Dworkin, M., y Sherman, D.H. (2004). Isolation and characterization of novel marine actinomycete taxa rich in secondary metabolites. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 7520-7529.

Maldonado, L.A., Stach, J.E.M., Pathom-aree, W., Ward, A.C., Bull, A.T., y Goodfellow, M. (2005a). Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie van Leeuwenhoek*. 80, 11-18.

Maldonado, L.A., Fenical, W., Jesen, P.R., Kauffman, C.A., Mincer, T.J., Ward, A.C., Bull, A.T., y Goodfellow, M. (2005b). *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. Nov. and *Salinispora tipica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae*. *International Journal of Systematic Evolution Microbiology*, 55, 1759-1766.

Maldonado, L.A., Fragoso, Y.D., Pérez, G.A., Rosellón, D.J., y Quintana, E.T. (2009). Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek*. 95, 111-120.

Maldonado, O., Zambrano, R., de León, F., Hernández, G. y Rólz, A. (2013). Evaluación de la producción microbiana de aceites a partir de la glicerina o glicerol proveniente de la producción de Biodiesel. *PROYECTO FODECYT 053-2009*. Guatemala, (pp.1-118).

Márquez M., Martínez, M., y Franco, M. (2003). Aislamiento de *Trichoderma* sp. y actinomycetes a partir de suelos de clavel (*Dianthus caryophyllus*) y evaluación de su capacidad antagónica in vitro sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi. *Revista Agronomía Colombiana*, 1(19), 81-88.

Martin A. (1981). *Introducción a la microbiología del suelo*. Ciudad de México: AGT editores.

McNeil, M.M. y Brown, J.M. (1994). The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 7(3), 357-417.

Meijer, W.G. y Prescott, J.F. (2004). *Rhodococcus equi*. *Veterinary Research*, 35 (4), 383-396.

Mincer, T.J., Jesen, P.R., Kauffman, C.A., y Fenical, W. (2002). Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Applied Environmental and Microbiology*, 68, 5005-5011.

Minnikin, D.E., Hutchinson, I.G., y Caldicott, A.B. (1980). Thin-layer chromatography of methanolisates of mycolic acid-containing bacteria. *Journal of Chromatography*, 188, 221-233.

Minnikin, D.E. (1982). Lipids: Complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles. En Ratledge, C. y Stanford, J.L. (Eds.), *The Biology of the Mycobacteria 1ra ed.* (pp. 95-184). London, UK: Academic Press.

Minnikin, D.E., Minnikin, S.M., Parlett, J.H. y Goodfellow, M. (1985a). Mycolic acid patterns of some rapid-growing species of Mycobacterium. *Zentralblatt für Bakteriologie, Microbiologie und Hygiene*, A259, 446-460.

Mittermeier, R. y Goettsch, C. (1992). La importancia de la diversidad biológica en México. En Sarukhán, J. y Dirzo, R. (Eds.), *México ante los retos de la biodiversidad* (pp. 57-62). México: CONABIO.

Montalbán-López, M., Sánchez-Hidalgo, M., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M. y Maqueda, M. (2011). Are bacteriocins underexploited? novel applications for old antimicrobials. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12(8), 1205-1220.

Mora, C., Tittensor, D.P., Adl, S., Simpsom, A.G.B., y Worm, B. (2011). How many species are there on earth and in the ocean. *PLOS Biology*, 9, 100-1127.

Nesterenko, O.A., Nogina, T.M., Kasumova, S.A., Kvasnikov, E.I. y Batrakov, S.G. (1982). *Rhodococcus luteus* nom. nov. and *Rhodococcus maris* nom. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 32, 1-14.

Niemi, R.M., Knuth, S., y Lundström, K. (1982). Actinomycetes and fungi in surface waters and in potable water. *Applied and Environmental Microbiology*, 43, 378-88.

Onaka, H., Mori, Y., Igarashi, Y. y Furumai T. (2011). Mycolic Acid-Containing Bacteria Induce Natural-Product Biosynthesis in Streptomyces Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 400-406.

Peczynska-Czoch, W., y Mordarski, M. (1988). Actinomycete enzymes. En Goodfellow, M. Williams, S.T. y Mordarski, M. (Eds.), *Actinomycetes in Biotechnology* (pp. 219-283). London, UK: Academic Press.

Pei, A.Y., Oberdorf, W.E., Nossa, C.W., Agarwal, A., Chokshi P., Gerz, E.A., Jin, Z., Lee, P., Yang, L., Poles, M., Brown, S.M., Sotero, S., Desantis, T., Brodie, E., Nelson, K. y Pei, Z. (2010). Diversity of 16S rRNA Genes within Individual Prokaryotic Genomes. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 3886-3897.

Pelaz-Guerra, G. (2014). *Aislamiento y estudio de la diversidad de las poblaciones de Actinobacterias presentes en muestras de compost*. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Agrarias y Ambientales, Salamanca.

Pedrós-Alió, C. (2006). Marine microbial diversity: can it be determined?. *Trends in Microbiology*, 14, 257-263.

Pidoux, O., Argenson, J.N., Jacomo, V. y Drancourt, M. (2001). Molecular identification of a *Dietzia maris* hip prosthesis infection isolate. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 2634-2636.

Prescott, L.M. (2002). *Microbiology*. 5th ed. Boston, Massachusetts, USA: Editorial McGraw-Hill.

Portevin, D., C. De Sousa-D'Auria, C., Houssin, C., Grimaldi, M., Chami, M., Daffe, y Guilhot, C. (2004). A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 6, 314-319.

Rainey, F.A., Burghardt, J., Kroppenstedt, R.M., Klatter, S. y Stackebrandt, E. (1995a). Phylogenetic analysis of the genera *Rhodococcus* and *Nocardia* and evidence for the evolutionary origin of the genus *Nocardia* from within the radiation of *Rhodococcus* species. *Microbiology*, 141, 523-528.

Rheims H., Spróer, C., Rainey, F.A., y Stackebrandt, E. (1999). Molecular biological evidence for the occurrence of uncultured members of the Actinomycete line of descent in different environments and geographical locations. *Microbiology*. 142, 2863-2870.

Ruiz-Herrera, J. (1994). Polyamines, DNA methylation, and fungal differentiation. *Critical Reviews in Microbiology*, 20, 143-150.

Saier, M.H. y Reizer, J. (1992). Proposed uniform nomenclature of the proteins and protein domains of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system based on structural, evolutionary and functional considerations. *Journal of Bacteriology*. 174, 1433-1438.

Serrano, J.A. y Sandoval, T.A.H. (2005). *Identificación y diagnóstico de Actinomicetales patógenos*. Publicaciones del Vicerrectorado Académico. Colección Ciencias de la Salud. Venezuela: Universidad de los Andes.

Sette, L.D., Simioni, K.C.M., Vasconcellos, S.P. Dussan, L.J., Neto, E.V.S. y Oliveira, V.M. (2007). Analysis of the composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazilian basin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 91, 253-266.

Shiba, T. y Simidu, U. (1982). *Erythrobacter longus* gen. nov., sp. nov., an aerobic bacterium which contains bacteriochlorophyll a. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 32, 211-217.

Sogin, M.L., Morrison, H.G., Humber, J.A., Welch, D.M., Huse, S.M., Neal, P.R., Arrieta, J., y Herndl, G.J. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplorer “rare biosphere”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 32, 12115-12120.

Sokolovská, I., Rozenberg, R., Riez, C., Rouxhet, P., Agathos, S., y Wattiau, P. (2003). Carbon source-induced modifications in the mycolic acid content and cell wall permeability of *Rhodococcus erythropolis* E1. *Applied Environmental Microbiology*, 69, 7019-7027.

Stach, J.E.M., Maldonado, L.A., Ward, A.C., Goodfellow, M. y Bull, A. (2003). New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. *Environmental Microbiology*, 5, 828-841.

Stackebrandt, E., Rainey, F.A. y Ward-Rainey, N.L., (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria classis* nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 479-491.

Staley, J.T., Gunsalus, R.P., Lory, S., y Perry, J.J. (2007). *Microbial life*. 2nd ed., Sunderland, EUA: Sinauer Associates, Inc.

Stratton, H., Seviour, R., y Brooks, P. (1997). Activated sludge foaming: what causes hydrophobicity and can it be manipulated to control foaming. En *Proceedings conf. on microorganisms in activated sludge and biofilm processes*. 2nd ed. Berkeley, California.

Swire J. (2007). Selection on synthesis cost affects interprotein amino acid usage in all three domains of life. *Journal of Molecular Evolution*, 64, 558-571.

Takahashi, Y., Iwai, Y., Tomoda, H., Nimura, N., Kinoshita, T. y Omura, S. (1989). Optical resolution of 2,6-diaminopimelic acid stereoisomers by high performance liquid

chromatography for the chemotaxonomy of actinomycete strains. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 35, 27-32.

Tao H., González R., Martínez A., Rodríguez M., Ingram L. O., Preston J. F., Shanmugam K. T. (2001). Engineering a homo-ethanol pathway in *Escherichia coli*: Increased glycolytic flux and levels of expression of glycolytic genes during xylose fermentation. *Journal of Bacteriology*, 183: 2979-2988.

Thawai, C., Tanasupawat, S., y Kudo, T. (2008). *Micromonospora pattaloongensis* sp. nov., isolated from a Thai mangrove forest. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 58, 1516-1521.

Tiago, I., Chung, A.P. y Verssimo, A. (2004). Bacterial diversity in a nonsaline alkaline environment: heterotrophic aerobic populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 7378-7387.

Timpe, A. y Runyon, E.H. (1954). The relationship of atypical acid-fast bacteria to human disease; a preliminary report. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44(2), 202-209.

Tokala K., Strap, C., y Jung, D. (2002). Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2161-2171.

Underwood S. A., Buszko M. L., Shanmugam K. T., Ingram L. O. (2002). Flux through citrate synthase limits the growth of ethanologenic *Escherichia coli* KO11 during xylose fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:1071-1081.

Van Ginkel, C.G., Welten, H.G.J., Hartmans, S., y de Bont. J.A.M. (1987). Metabolism of trans-2-butene and butane in *Nocardia* TB1. *Journal of General Microbiology*, 133,713-1720.

Veiga-Crespo, P., Blasco, L., Rosa-Dos-Santos, F., Poza, M., Villa, T.G. (2005). Influence of culture conditions of *Gordonia jacobaea* MV-26 on canthaxanthin production. *International Microbiology*, 8, 55-58.

Vessey, J.K. (2003). Plant growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*, 255, 571-586.

Vetrovsky, T. y Baldrian, P. (2013). The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. *Public Library of Science ONE*, 8, e57923.

Waksman, S.A., y Henrici, A.T. (1943). The nomenclature and classification of the actinomycetes. *Journal of Bacteriology* 46, 337-341.

Whitman, W.B., Coleman, D.C., y Wiebe, W.J. (1998). Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 6578-6583.

Wick, L., Wattiau, P., y Harms, H. (2002). Influence of the growth substrate on the mycolic acid profiles of mycobacteria. *Environmental Microbiology*, 4, 612-616.

Williams, D.R., Trudgill, P.W., y Taylor, D.G. (1989). Metabolism of 18-cineole by a *Rhodococcus* species: Ring cleavage reactions. *Journal of General Microbiology*, 135, 1957-1967.

Yamaguchi, T. (1965). Comparison of the cell-wall composition of morphologically distinct actinomycetes. *Journal of Bacteriology*, 89(2), 444-453.

Yassin, A.F., y Hupfer, H. (2006). *Williamsia deligens* sp. nov., isolated from human blood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 193-197.

Yassin, A.F., Hupfer, H., y Schaal, K.P. (2006). *Dietzia cinnamea* sp. nov., a novel species isolated from a perianal swab of a patient with a bone marrow transplant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 641-645.

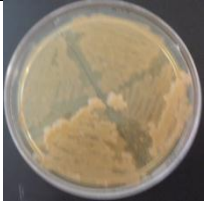
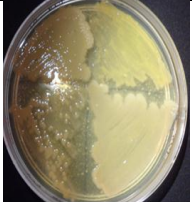
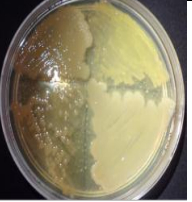



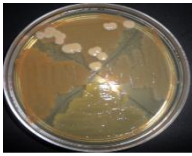



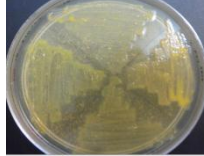
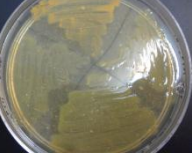
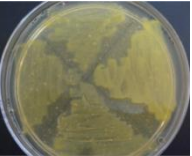
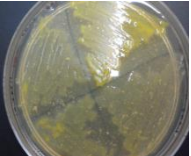
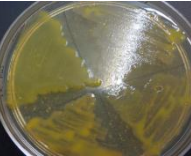
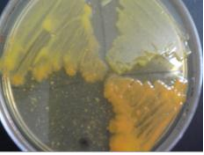
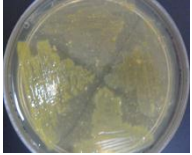
Yurkov, V., Stackebrandt, E., Holmes, A., Fuerst, J.A., Hugenholtz, P., Golecki, J., Gad'on, N., Gorlenko, V.M., Kompantseva, E.I. y Drews, G. (1994). Phylogenetic positions of novel aerobic, bacteriochlorophyll a-containing bacteria and description of *Roseococcus thiosulfatophilus* gen. nov., sp. nov., *Erythromicrobium ramosum* gen. nov., sp. nov. and *Erythrobacter litoralis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 427-434.

Zaitlin, B., Watson, S.B., Dixon, J., y Steel, D. (2003). Actinomycetes in the Elbow river basin, Alberta, Canada. *Water Quality Research Journal of Canada*, 38, 115-25.

Zhang, Z., Wang, Y., y Ruan, J. (1997). A proposal to revive the genus *Kitasatospora* (Omura, Takahashi, Iwai, and Tanaka 1982). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 1048-1054.

Anexos

Resiembra de UFC

				
Figura 3. Resiembra de UFC en GYM-conc, se recuperaron 2 colonias	Figura 4. Resiembra de UFC en GYM-conc, no hubo recuperación	Figura 5. Resiembra de UFC en GYM-conc, no hubo recuperación	Figura 6. Resiembra de UFC en GYM-conc, no hubo recuperación	Figura 7. Resiembra de UFC en GYM-conc, no hubo recuperación
				
Figura 8. Resiembra de UFC en GYM-conc, no hubo recuperación	Figura 9. Resiembra de UFC en GYM-conc, no hubo recuperación	Figura 10. Resiembra de UFC en GYM-conc, se recuperaron 2 colonias	Figura 11. Resiembra de UFC en GYM-conc, se recuperaron 3 colonias	Figura 12. Resiembra de UFC en GYM-conc, se recuperaron 2 colonias
				
Figura 13. Resiembra de UFC en GYM-conc, se recuperaron 2 colonias	Figura 14. Resiembra de UFC en GYM-conc, se recuperaron 4 colonias	Figura 15. Resiembra de UFC en GYM-conc, se recuperaron 3 colonias	Figura 16. Resiembra de UFC en GYM-conc, se recuperaron 4 colonias	Figura 17. Resiembra de UFC en GYM-conc, se recuperaron 3 colonias
				
Figura 18. Resiembra de UFC en GYM-conc, no hubo recuperación	Figura 19. Resiembra de UFC en GYM-conc, se recuperó 1 colonia			

Medios de cultivo

Los medios fueron esterilizados por 15 minutos.

GYEA

(Agar Glucosa extracto de Levadura; Gordon y Mihm, 1962)

Glucosa	10 g
Extracto de levadura	10 g
Agar	12 g
Agua destilada	1000 mL
pH 7.2	

GYM

(Agar Glucosa extracto de Levadura y Malta; Catálogo DSMZ, 2001)

Glucosa	4 g
Extracto de levadura	4 g
Extracto de malta	10 g
Carbonato de calcio	2 g
Agar	12 g
Agua destilada	1000 mL
pH 7.0- 7.2	

Medio basal

(Shirling & Gottlieb, 1966) fuentes nitrógeno

D-glucosa	10 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	5 g
NaCl	0.5 g
FeSO ₄ .H ₂ O	0.01 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
Agar	18 g
Agua bidestilada	1000 mL
pH 7.4	

ISP-9

(Shirling & Gottlieb, 1966) Fuentes de carbono

(NH ₄)SO ₄	2.64 g
KH ₂ PO ₄	2.38 g
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	5.65 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.0 g
Solución sales traza(Pridham τ Gottlieb)	1 mL
Agar	18 g
Agua bidestilada	1000 mL
pH 6.8-7.0	

Electroforesis horizontal

Se pesaron 0.25g de agarosa, se añadió en un matraz Erlenmeyer con 25 ml de buffer TAE pH 1X, se homogenizó la mezcla calentando en una placa, se dejó enfriar hasta aproximadamente 45°C y se añadió 1.25 µL de marcador SYBR, se mezcló el contenido y se vertió en una cámara de electroforesis horizontal, dejándose solidificar de 25 a 30 minutos

En el primer carril se colocaron 0.9 µL de marcador, en los carriles 2 a 6 se colocó la muestra de ADN, (2 µL de ADN y 1 µL de colorante), se dejó correr el gel durante 45 minutos a 75 W.