



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE AGAR ARROZ COMO  
HERRAMIENTA PARA LA CARACTERIZACIÓN DE  
ACTINOBACTERIAS DE ORIGEN ACUATICO**

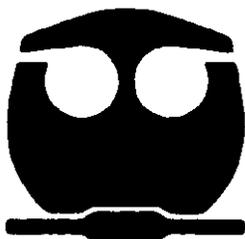
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

AURORA ANAIS ZURITA CRUZ



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

---

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE: Profesor: RODOLFO PASTELIN PALACIOS**

**VOCAL: Profesor: MARÍA GUADALUPE TSUZUKI REYES**

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

**1º SUPLENTE: Profesor: MARTHA GILES GOMEZ**

**2º SUPLENTE: Profesor: BEATRIZ VILLAFAN RUÍZ**

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Laboratorio de Biodiversidad y Bioprospección Microbiana. Ciudad Universitaria, México, D.F.

**ASESOR DEL TEMA: DR. LUIS ÁNGEL MALDONADO MANJARREZ**

---

**SUSTENTANTE: AURORA ANAIS ZURITA CRUZ**

---

---

## **AGRADECIMIENTOS**

- A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Química y a todos mis profesores por ser el eslabón más importante de mi formación profesional.
- Agradezco al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Ciudad Universitaria UNAM por el uso de sus instalaciones para la realización del presente trabajo de investigación.
- Y en particular agradezco al Dr. Luis Ángel Maldonado Manjarrez, por haberme abierto las puertas de su laboratorio y darme la confianza para realizar este trabajo, que sin su apoyo me hubiera sido imposible realizar esta tesis. Por su paciencia y apoyo que me brindó, así como sus conocimientos y habilidades que me transmitió.
- A la Dra. Erika Quintana, por ser parte importante de este trabajo experimental, por sus opiniones y consejos.
- A mis compañeros de laboratorio por compartir sus conocimientos y experiencias conmigo.
- A los profesores, Rodolfo Patelin Palacios y María Guadalupe Tsuzuki Reyes, por las revisiones y correcciones pertinentes que realizaron a este trabajo.
- Parte del trabajo experimental de esta tesis fue realizado con recursos del proyecto DGAPA PAPIIT IN212011 asignado al Dr. Luis Ángel Maldonado Manjarrez.

---

## DEDICATORIAS

- Quiero dedicar esta tesis a mi mamá, que ha sido la responsable de mi educación profesional. Mamá, tú has sido mi inspiración a luchar día a día por lo que quiero y por mis sueños. Tú has sido mi apoyo en todo momento, mi ejemplo a seguir y mi heroína. Gracias por tu entrega y amor hacia mí, gracias por enseñarme a ser una buena persona con principios, ideales y educación.
- Al químico que me inspiró a ser lo que soy profesionalmente, a mi papá, un ejemplo de perseverancia, inteligencia y siempre tener una respuesta a mis preguntas.
- A mis hermanos: Jessie y Juan Pablo, por todo el apoyo en mi formación académica, que me ha servido para alcanzar esta meta.
- A mi sobrino Uriel por alegrar mi vida.
- A Ariel por el apoyo incondicional, compañía y consejos para la integración de este trabajo. Y por ser una inspiración en mi vida.
- A todos mis amigos por su leal compañía, por haberme apoyado en momentos difíciles, por tantas alegrías que hemos pasado juntos y por ser una parte importante de mí.
- A todas esas personas que estuvieron a mi lado durante mi formación profesional y que me ayudaron en todo momento.

*"Por mi raza hablará el espíritu"*

---

## ÍNDICE

RESUMEN .....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>2</b>
1.1. Diversidad acuática .....	2
1.2. Clase <i>Actinobacteria</i> .....	3
1.3. Género <i>Streptomyces</i> .....	6
1.4. Caracterización microbiana .....	14
1.4.1. Aspectos fenotípicos de la caracterización microbiana .....	14
1.4.2. Aspectos genotípicos de la caracterización microbiana .....	16
1.4.2.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	17
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>21</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>22</b>
<b>5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>23</b>
5.1. Actinobacterias de origen acuático .....	24
5.2. Caracterización fenotípica .....	25
5.2.1. Utilización de fuentes de carbono y nitrógeno .....	25
5.2.2. Pruebas de degradación .....	28
5.2.3. Tolerancia a diferentes concentraciones de Cloruro de Sodio (NaCl).....	29
5.3. Caracterización quimiotaxonómica .....	30
5.3.1. Ácido diaminopimélico (DAP) .....	30
5.3.1.1. Extracción de DAP .....	30
5.3.1.2. Corrimiento y revelado de la placa TLC .....	31
5.4. Caracterización genotípica .....	33
5.4.1. Extracción de DNA.....	33
5.4.2. PCR.....	36
5.4.3. Electroforesis horizontal, agarosa al 1%.....	37
5.4.4. Secuenciamiento del producto de PCR .....	39
5.4.5. BLAST y Ez Taxon .....	40
5.5. Evaluación del medio de arroz .....	41

---

<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	43
6.1. Caracterización fenotípica .....	43
6.1.1. Utilización de fuentes de carbono y de nitrógeno .....	43
6.1.1.1. Fuentes de carbono .....	43
6.1.1.2. Fuentes de nitrógeno .....	51
6.1.2. Pruebas de degradación .....	58
6.1.3. Tolerancia a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) .....	61
6.2. Caracterización quimiotaxonómica .....	64
6.2.1. DAP .....	64
6.3. Caracterización genotípica .....	65
6.3.1. PCR.....	65
6.3.2. BLAST y EzTaxon .....	66
6.4. Evaluación del medio de arroz .....	71
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	84
<b>8. PERSPECTIVAS</b> .....	86
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	87
<b>10. ANEXOS</b> .....	94
10.1. Medios de cultivo .....	94
10.2. Soluciones y reactivos .....	97
10.3. Gráficas de crecimiento de fuentes de carbono, nitrógeno y degradación de aminoácidos a 7 y 14 días .....	99
10.4. Resultados del BLAST para cada uno de los aislados.....	105
10.4.1. Aislado 9(13) .....	105
10.4.2. Aislado ae(4) .....	105
10.4.3. Aislado AK-1 .....	106
10.4.4. Aislado AL-2 .....	106
10.4.5. Aislado e(23) .....	107
10.4.6. Aislado Emma-6-12 .....	107
10.4.7. Aislado f(12).....	108
10.4.8. Aislado HAR-17 .....	108
10.4.9. Aislado HAR-18 .....	109
10.4.10. Aislado OAG-B1.....	109

---

10.4.11. Aislado OAG-G1.....	110
10.4.12. Aislado P5.....	110
10.4.13. <i>S. griseus</i> .....	111
10.4.14. <i>S. yatensis</i> .....	111
10.5. Resultados del Ez Taxon para cada uno de los aislados .....	112
10.5.1 Tabla general de resultados .....	112
10.5.2. Aislado 9(13).....	112
10.5.3. Aislado ae(4) .....	113
10.5.4. Aislado AK-1 .....	113
10.5.5. Aislado AL-2 .....	114
10.5.6. Aislado e(23) .....	114
10.5.7. Aislado Emma-6-12 .....	115
10.5.8. Aislado f(12).....	115
10.5.9. Aislado HAR-17 .....	116
10.5.10. Aislado HAR-18 .....	116
10.5.11. Aislado OAG-B1.....	117
10.5.12. Aislado OAG-G1.....	117
10.5.13. Aislado P5.....	118
10.5.14. <i>S. griseus</i> .....	118
10.5.15. <i>S. yatensis</i> .....	119

---

## RESUMEN

La clase *Actinobacteria* comprende a bacterias Gram positivas con un alto contenido de Guanina y Citosina que incluye géneros de importancia económica y médica para el ser humano. En el área farmacéutica, el género *Streptomyces* tiene más de 600 especies que cuentan en su gran mayoría con la capacidad innata para producir metabolitos secundarios entre los que destacan sobre todo antibióticos y antitumorales. Desde mediados de los años 60's, la caracterización de nuevos estreptomicetos ha sido tradicionalmente realizada a partir del medio ISP-3 (**I**nternational **S**treptomyces **P**roject Media Number 3 o agar avena) que permite observar y registrar las propiedades macro- y microscópicas del microorganismo en estudio o en evaluación. Sin embargo, no todas las especies desarrollan bien en este medio por lo que son necesarias nuevas alternativas que pudieran contribuir también a una caracterización confiable ante el gran número de especies que el género incluye y el constante aislamiento de nuevas especies. En el presente trabajo se evaluó un medio de cultivo a base de arroz para la caracterización de actinobacterias con características típicas de *Streptomyces* aislados de medios acuáticos lo que en conjunto con pruebas fenotípicas y genotípicas permitieron además establecer las relaciones entre cepas de referencia y los aislados de estudio.

### **Palabras clave**

*Actinobacteria*, *Streptomyces*, arroz, pruebas fenotípicas y genotípicas.

## 1. INTRODUCCIÒN

### 1.1. Diversidad acuática

Si consideramos que el 75% de nuestro planeta está cubierto por agua y que cerca del 70% de ella lo constituye el agua de los océanos, no es raro pensar que a la fecha existe una enorme cantidad de microorganismos desconocidos por el hombre y aún por descubrir. Un estimado a este respecto empleando herramientas moleculares sugiere que la biodiversidad microbiana puede alcanzar las  $3.6 \times 10^{29}$  células microbianas/mL en los océanos (Sogin *et al.*, 2006).

En términos de la biodiversidad microbiana que pudiera albergar, el mundo acuático representa una fuente poco estudiada aunque seguramente constituyen un extraordinario reservorio microbiano. Los microorganismos constituyen uno de los pilares de la biosfera pues cuentan con la capacidad metabólica única de llevar a cabo los ciclos biogeoquímicos que son básicos para el sostén y desarrollo de la vida misma (Hunter-Cervera, 1998; Madigan *et al.*, 2004).

Hasta hace varios años, el aislamiento de nuevos microorganismos estuvo orientado hacia aquellos provenientes de ecosistemas en su mayoría terrestres. Sin embargo, de los últimos 10 años a la fecha el descubrimiento de nuevos microorganismos también se ha ido orientando hacia el estudio de ambientes inusuales o con condiciones poco comunes. En este sentido, el aislar especies microbianas metabólicamente adaptadas a un ecosistema diferente realza la importancia del estudio de nuevas áreas microbiológicas tales como la microbiología marina y molecular, así como la diversidad microbiana en

ecosistemas específicos o muy particulares (Mincer *et al.*, 2002; Maldonado *et al.*, 2005; Maldonado *et al.*, 2009; Quintana *et al.*, 2012).

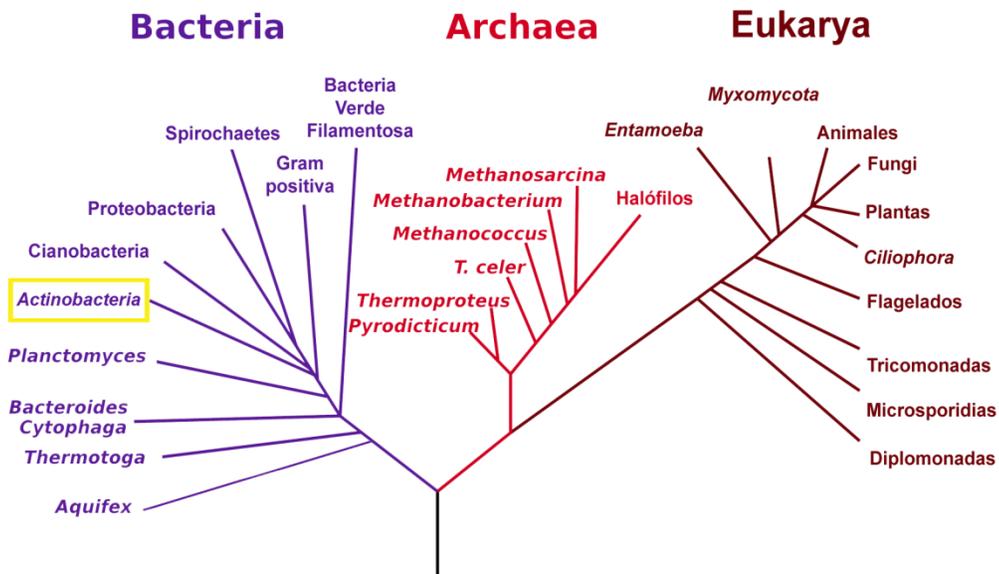
## **1.2. Clase *Actinobacteria***

Las bacterias Gram-positivas se dividen en 2 grandes ramas: los organismos con bajo contenido de guanina y citosina (G+C), conteniendo géneros como *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*, básicamente del filum *Firmicutes*; y los organismos de alto contenido de guanina y citosina, denominados genéricamente como “*actinomicetos*”. Muchos de estos últimos, aunque no todos, muestran un ciclo de vida inusual para una bacteria pues desarrollan micelio en alguna etapas de su vida, lo que originalmente hizo que por muchos años se les considerara como “hongos”, precisamente por su similitud morfológica (Dworkin *et al.*, 2007).

El origen de la palabra actinomiceto tiene una larga historia taxonómicamente confusa. Su origen proviene de los siguientes vocablos griegos: *actino* “rayo” y *myces* “hongo”, por lo que una definición estricta sería “*hongo radiado*”. La primera clasificación formal de este vasto grupo de microorganismos la realizaron Waksman y Henrici (1943), al considerar dichos microorganismos como un “puente evolutivo entre bacterias y hongos”.

No fue sino hasta después de numerosos estudios basados en las propiedades quimiotaxonómicas y, particularmente, con la comparación de secuencias ribosomales del gen 16S rRNA, que finalmente se estableció que estos microorganismos se encuentran relacionados filogenéticamente a las Eubacterias ocupando un lugar cercano con las bacterias Gram positivas. Fue precisamente la conjunción de los

estudios mencionados que permitieron a Stackebrandt *et al.* (1997) proponer la clase *Actinobacteria* (Figura 1).



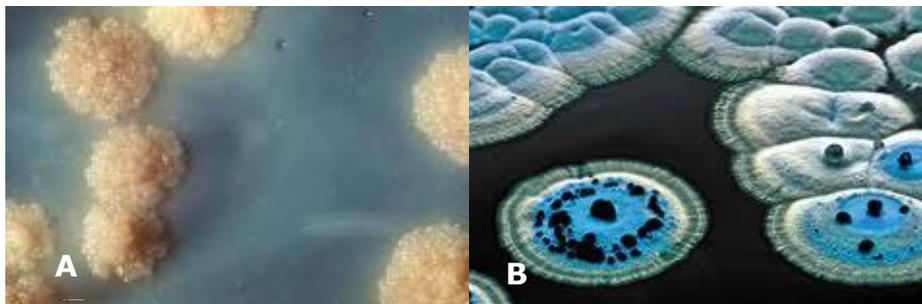
**Figura 1.** Árbol filogenético de los seres vivos (visión global) mostrando la posición de la clase *Actinobacteria*.

La clase *Actinobacteria* exhibe una variedad muy amplia de morfologías macro y microscópicas que van desde lo cocoide, coco-bacilos y bacilos hasta fragmentos de hifas y micelios altamente diferenciados (Staley *et al.*, 2007). Macroscópicamente algunos de los géneros presentan una morfología colonial similar a las típicas colonias bacterianas pero con consistencia particularmente dura o rugosa. También exhiben diversas propiedades metabólicas y fisiológicas contando con una capacidad innata para la síntesis tanto de metabolitos primarios como secundarios

que cuentan con un impacto económico directo en la humanidad. Grupos específicos de la clase *Actinobacteria* pueden sintetizar desde enzimas como proteasas e hidrolasas, moléculas con propiedades antimicrobianas (antibacterianos y antifúngicos), anticancerígenos e inclusive hasta conservadores de alimentos (Demain, 2000).

La clase *Actinobacteria* se encuentra ampliamente distribuída tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos. Dentro de esta "variedad", se les puede encontrar como patógenos de animales y plantas, comensales de plantas, simbioses fijadores de nitrógeno, habitantes del tracto gastrointestinal y hasta como comensales del suelo (Madigan *et al.*, 2004; Staley *et al.*, 2007).

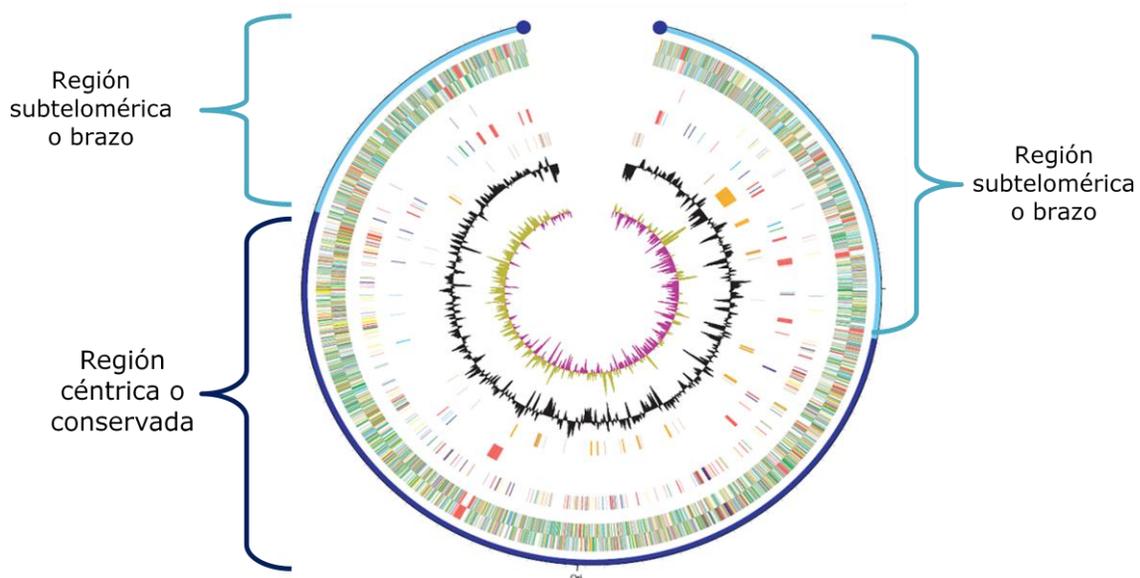
Gran parte de la importancia en el estudio de *Actinobacteria* está centrada en dos géneros de alto impacto económico para la salud pública: a) *Mycobacterium*, los cuales incluyen al agente causal de la tuberculosis, una de las enfermedades más antiguas en la historia de la humanidad y b) *Streptomyces*, los cuales son el modelo genético por excelencia en cuanto a la producción de la gran mayoría de los antibióticos empleados de manera comercial (Figura 2; Baltz, 2007; Ventura *et al.*, 2007).



**Figura 2.** A) Fotografía de colonias de *Mycobacterium tuberculosis* (Murray *et al.*, 2003) y B) Fotografía de colonias de *Streptomyces coelicolor* (Hopwood, 2007).

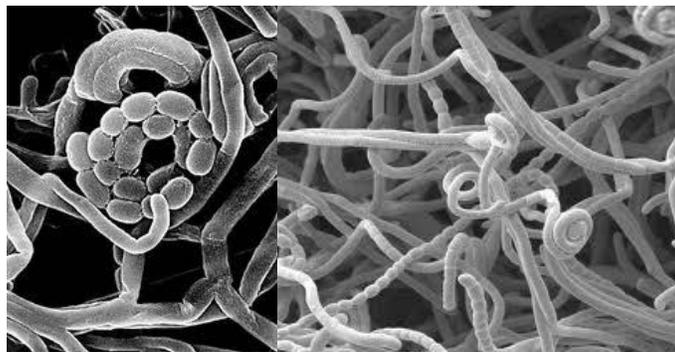
### 1.3. Género *Streptomyces*

El género *Streptomyces* es el más extenso no solo dentro de la clase *Actinobacteria* sino inclusive dentro de todos los grupos microbianos conocidos (Euzéby, 2007; Labeda *et al.*, 2012). Los estreptomicetos tienen una pared celular tipo I, es decir, su pared está caracterizada por la presencia del ácido *LL*-diaminopimélico (DAP) y glicina sin ningún tipo de azúcares característicos (Anderson & Wellington, 2001). El contenido de G+C se ha reportado entre el 69 y el 78%. De los estreptomicetos cuyos genomas han sido secuenciados a la fecha, todos muestran una estructura común (Figura 3). En general, son genomas grandes con valores que oscilan entre los 8 y los 9 millones de pares de bases (Mbp) con excepción del patógeno *S. somaliensis* que tiene un genoma apenas cercano a los 6 Mbp (Ohnishi *et al.*, 2008; Contreras, 2011; Hoskisson comunicación personal). A diferencia de otros cromosomas bacterianos, el cromosoma de *Streptomyces* es lineal (Contreras, 2011; Volff & Altenbuchner, 2000).

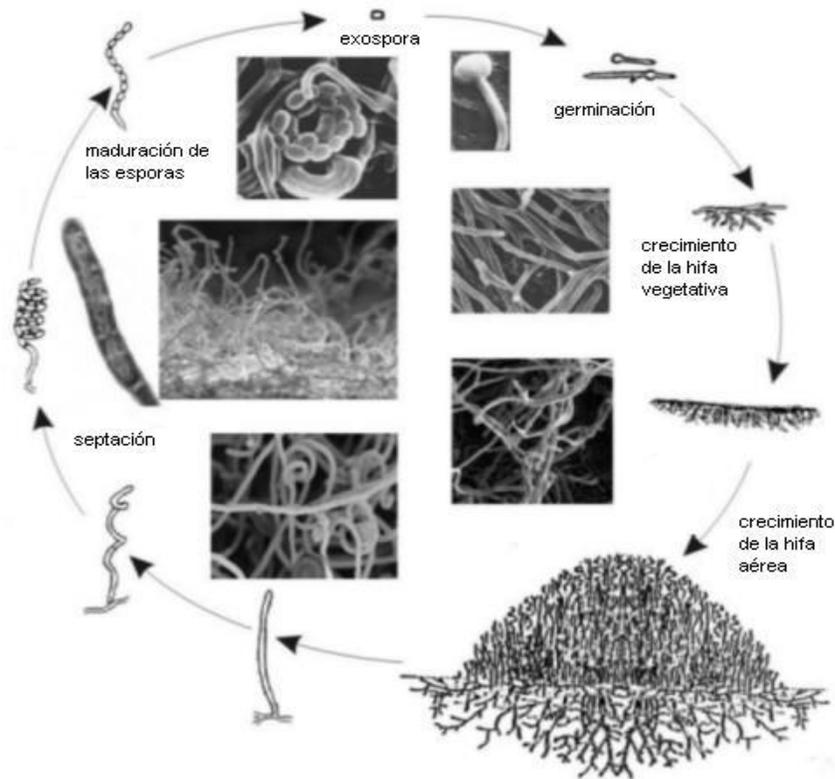


**Figura 3.** Representación circular del cromosoma y regiones del genoma de *Streptomyces coelicolor* (adaptado de Contreras, 2011).

Los estreptomicetos tienen, comparándolos con otras bacterias, un ciclo de vida atípico. El ciclo comienza con una espora, también llamada *artrospora* o *conidia* y conforme la colonia va creciendo, se empieza a presentar la aparición de hifas tanto aéreas como de sustrato. El micelio e hifas de sustrato (que en caso de estar presentes no muestran fragmentación) resultan ser células que se desarrollan sobre la superficie del medio de cultivo y dentro de él, seguramente para garantizar el acceso a los nutrientes pues cada hifa funciona o actúa succionando los sustratos del medio (Koneman *et al.*, 1999; Contreras, 2011). Por otro lado y conforme la colonia va envejeciendo, se observa el desarrollo de hifas y micelio aéreos que crecen sobre la superficie del medio o sobre el micelio de sustrato. Estas células se dividen en un solo plano hasta lograr formar cadenas desde 3 hasta 50 conidiosporas inmóviles, con texturas superficiales que pueden ser lisas, espinosas o verrugosas (Koneman *et al.*, 1999; Prescott *et al.*, 1999; Bergey's Manual, 2012, Figura 4). El ciclo se completa cuando las esporas pueden ser liberadas al ambiente encontrando (tal vez) nuevas condiciones para establecer una nueva comunidad microbiana (Figura 5).



**Figura 4.** Microscopía electrónica de colonias de *Streptomyces* mostrando la hifa y esporas (<http://www.bioc.cam.ac.uk/uto/hong.html>).



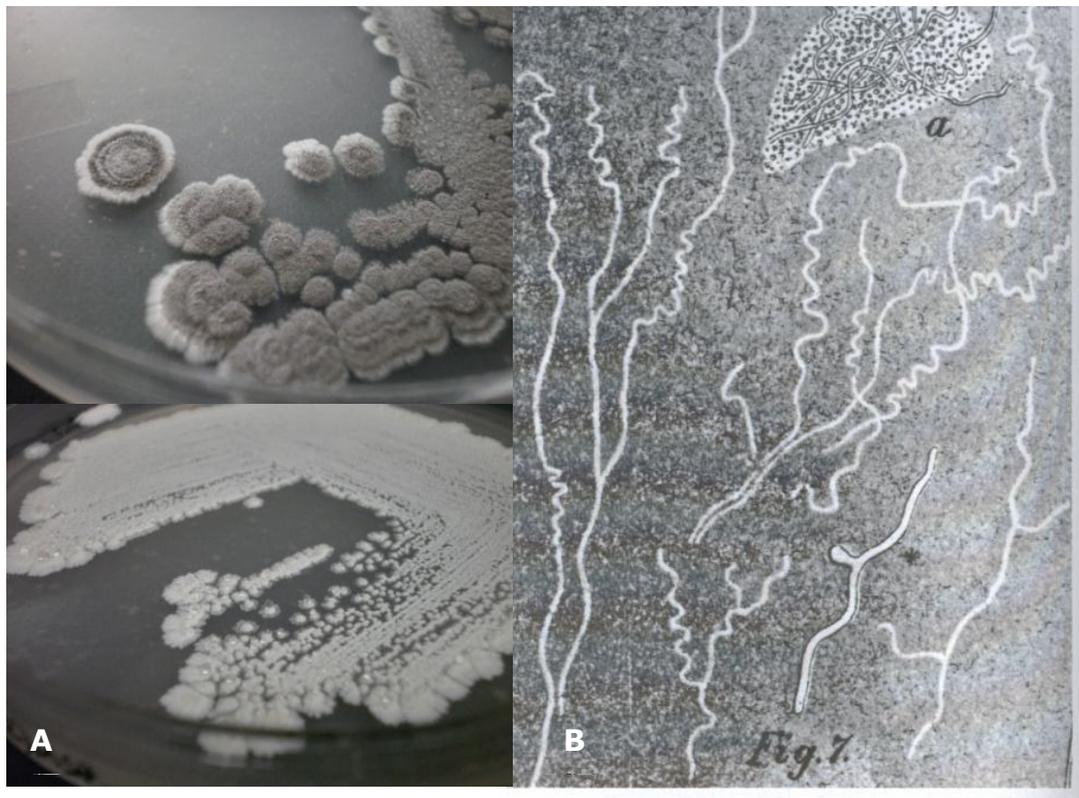
**Figura 5.** Ciclo de vida de los miembros del género *Streptomyces* (<http://www.iitd.pan.wroc.pl/Dept/Mic/gb/projects.html>).

El género *Streptomyces* toma su nombre del griego, *streptos*, doblados o torcidos; y *myces*, hongo (Bergey's Manual, 2012) e incluye mas de 615 especies. Las especies del género son consideradas como aerobias y forman cadenas de esporas inmóviles con una vaina fina y fibrosa (Prescott *et al.*, 1999; Bergey's Manual, 2012). Los conidios de cada cadena a menudo están pigmentados lo que por varios años fue empleado como una guía para la caracterización de las especies (Labeda *et al.*, 2012).

Las colonias de los estreptomicetos forman colonias discretas y liquenoides, algodonosas o butirosas con una superficie que inicialmente es relativamente suave pero conforme se desarrolla el micelio aéreo se

vuelve flocosa, granular, polvorienta o aterciopelada. Es precisamente por esta última peculiaridad que por muchos años se les consideró como hongos y de ahí inclusive el término del género: "*hongo doblado o torcido*" (Figura 6).

La mayoría de las colonias muestran desarrollo a temperaturas óptimas de crecimiento entre los 25 y 35°C creciendo mejor entre valores de pH de 5.0 a 8.0. Debido a lo extenso del género, algunas especies muestran crecimiento a temperaturas psicrófilicas y otras tienen requerimientos ácidos o alcalinos para su crecimiento aunque usualmente se trata de pocas especies (Rodríguez, 2004).



**Figura 6.** A: Fotografías de colonias de *Streptomyces*, B: Dibujos de *Streptomyces* (el "hongo torcido") por Cohn (Hopwood, 2007).

Las especies del género *Streptomyces* cuentan con una capacidad innata para la síntesis de metabolitos primarios y secundarios que son compuestos que se obtienen a partir del metabolismo celular. Los metabolitos secundarios (moléculas producidas generalmente después del crecimiento bacteriano) tienen una importancia económica muy alta sobre todo en el área farmacéutica. Los estreptomicetos son fuentes naturales de antibióticos, antihelmínticos, antitumorales, biopesticidas, inhibidores enzimáticos, inmunosupresores (entre otros) pues cuentan con rutas metabólicas exclusivas para la síntesis de toda esta amplia gama de compuestos bioactivos (Demain, 2000; Korolkovas & Burckhalter, 1983; Magarvey *et al.*, 2004).

La importancia de la producción de antibióticos por *Streptomyces* está reflejada en que el número total de antibióticos producidos por bacterias y hongos es de 10,000. Los actinomicetos son responsables de la tercera parte de ese número y dentro de los actinomicetos los estreptomicetos ocupan del 70 al 80% de la producción total de estos metabolitos secundarios (Challis & Hopwood, 2003).

Para el establecimiento de especies dentro del género *Streptomyces* se emplean una mezcla de características morfológicas y fisiológicas entre las que se encuentran: a) el color de los micelios aéreos y de sustrato, b) la disposición de las esporas, c) las características superficiales de la espora, d) la utilización de carbohidratos, e) la producción de antibióticos, f) la síntesis de mielina, g) la reducción de nitrato, y h) la hidrólisis de la urea y ácido hipúrico (Prescott *et al.*, 1999). Sin embargo, dado el altísimo número de especies que actualmente han sido descritas y que el género alberga, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas para el estudio y la caracterización de posibles nuevas especies de *Streptomyces*.

En este sentido, el trabajo de Shirling y Gottlieb (1968), resultó pionero en cuanto al empleo de diferentes medios de cultivo estandarizados para lograr un consenso en cuanto al número de especies del género *Streptomyces*. El trabajo incluyó y desarrolló diferentes medios de cultivo denominados "ISP" (**I**nternational **S**treptomyces **P**roject) que fueron evaluados entre distintos laboratorios del mundo junto con cepas de referencia. Este trabajo, constituye la base de la caracterización de especies de *Streptomyces* pero a la fecha ha resultado insuficiente como método para la caracterización de nuevas especies pues se encuentra exclusivamente basado en aspectos fenotípicos (Labeda *et al.*, 2012). El trabajo de Labeda y colaboradores (2012) ofrece una visión que une lo realizado en trabajos previos basados en la caracterización con medios ISP y el marcador molecular del gen del 16S ribosomal que es empleado como un marcador o reloj biológico permitiendo establecer las relaciones filogenéticas entre especies (Labeda *et al.*, 2012).

En los trabajos basados en el uso de los medios ISP, características tales como el color del micelio aéreo o vegetativo, la configuración de las cadenas de esporas y la ornamentación de las esporas fueron empleadas como marcadores taxonómicos utilizando tiempos de incubación bien definidos y medios de cultivo específicos (Shirling & Gottlieb, 1966). Actualmente la observación de las características mencionadas se lleva a cabo únicamente en 2 o 3 medios de toda la serie ISP: el agar extracto de soya y tripticasa, el agar avena y/o medio de Bennett, siendo el agar avena el denominado ISP-3. El empleo del ISP-3 para el estudio de las características mencionadas se basa en el buen crecimiento que muestran los *Streptomyces* en este medio y su aspecto. Este medio es de color blanco lo que permite la observación de distintos colores de acuerdo al crecimiento del microorganismo de estudio. En un principio, se desarrolló una rueda de colores para la

determinación del color del micelio (Tresner & Backus, 1963), aunque su uso era algo problemático debido a las grandes diferencias entre especies. Fue hasta años después que Shirling y Gottlieb (1966) realizaron un estudio más a fondo de caracterización, en el que además del color, se ayudaron con la configuración de las cadenas de esporas, la cual actualmente es determinada por microscopía de electrones y asignada a una de las siguientes categorías: rectas, curvas, en forma de espiral y verticiladas. Idealmente, sólo una configuración es encontrada en una cepa, aunque se han reportado combinaciones de distintas configuraciones (Shirling & Gottlieb, 1968; Bergey's Manual, 2012). La ornamentación de las esporas puede ser suave, espinosa, rugosa o peluda lo que sin duda ha contribuido al estado confuso del género *Streptomyces* así como las dificultades para realizar estudios comparativos por el elevado número de especies que contiene.

La producción de pigmentos depende en gran parte de la composición del medio y las condiciones de cultivo y son utilizados también como marcadores taxonómicos. Los pigmentos solubles son predictivos en muchos casos para la producción de componentes bioactivos. En muchas ocasiones, las diferencias entre especies de *Streptomyces* no solo radican en sus pigmentos sino también en la producción de sus metabolitos secundarios por lo que la búsqueda y evaluación de medios alternos al ISP-3 pero que compartan algunas de sus características podría ser de utilidad para la identificación de posibles nuevas especies.

Una alternativa a lo anterior, podría ser el empleo de arroz en lugar de avena ya que ambos contienen almidón además de ofrecer como contraste el color blanco del medio si se desarrollara un medio de cultivo con este cereal (Tabla 1).

**Tabla 1.** Composición de avena en hojuela y del arroz en grano respectivamente (Dendy, 2004).

AVENA		ARROZ	
Agua	13.30%	Agua	15.50%
Proteínas	12.0g	Proteínas	6.2g
Carbohidratos (almidón)	60.0g	Carbohidratos (almidón)	76.9g
Grasas	0.8g	Grasas	7.1g
Fibra	6.0g	Fibra	0.3g
Calcio	79.6mg	Calcio	6.0mg
Fósforo	130mg	Fósforo	160mg
Hierro	5.8mg	Hierro	0.4mg
Tiamina	0.52mg	Sodio	2.0mg

Una de las características quimiotaxonómicas más importantes para la identificación de estreptomicetos es la pared celular de peptidoglicano ya que contiene grandes cantidades de ácido LL-diaminopimélico (LL-A<sub>2</sub>pm). La pared celular de *Streptomyces* muestra la típica ultraestructura y composición química de las bacterias Gram-positivas que tiene una estructura de varias capas de cadenas de peptidoglicano. El peptidoglicano es un heteropolímero que consiste de cadenas de heteropolisacáridos unidas entre sí por pequeñas unidades peptídicas. La base del peptidoglicano es construída alternando unidades  $\beta$ -1,4 de N-acetilglucosamina (NAG) y ácido N-acetilmurámico (NAM). El grupo carboxilo del ácido murámico es sustituido por un oligopéptido alternando los aminoácidos D- y L (Schleifer & Kandler, 1972). *Streptomyces* se caracteriza por el tetrapéptido L-Ala-D-Glu-LL-A<sub>2</sub>pm-D-Ala que está unido por un puente de pentaglicina, característica común en las bacterias Gram positivas y ausente en las Gram negativas.

## **1.4. Caracterización microbiana**

Una parte integral en la identificación de los microorganismos, es el empleo de pruebas que incluyan las características fenotípicas y genotípicas de éstos.

### 1.4.1. Aspectos fenotípicos de la caracterización microbiana

El análisis de la composición de la célula microbiana revela que más del 95% del peso seco de la célula está constituido por unos pocos elementos: carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, azufre, fósforo, potasio, calcio, magnesio y hierro. Por lo tanto, estos elementos son necesarios para el crecimiento bacteriano, además de condiciones físicas como pH, concentración de oxígeno, temperatura, presión atmosférica, salinidad y disponibilidad de agua (Prescott *et al.*, 1999; Madigan *et al.*, 2004).

En general, la característica nutricional más notable de los microorganismos es su extraordinaria flexibilidad en relación con las fuentes de carbono, debido a que son el principal constituyente de la materia celular. Prácticamente, no existe ninguna molécula orgánica natural que no pueda ser empleada metabólicamente por un microorganismo ya sea éste una arquea o una bacteria. (Prescott *et al.*, 1999; Madigan *et al.*, 2004).

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

macronutrientes y son elementos necesarios para gran parte del crecimiento microbiano (Madigan *et al.*, 2004).

Entre las diferentes pruebas empleadas para la caracterización microbiana, la utilización de éstos dos macronutrientes se ha evaluado de manera tradicional desde los años 60's para establecer una matriz que describa el perfil metabólico del o de los microorganismos de estudio o interés (Sneath, 1957). Estas pruebas junto con el crecimiento a diferentes temperaturas y una curva de crecimiento a diferentes valores de pH permiten establecer no solo el diseño de esquemas de identificación (conocidos como "*tablas de identificación*") sino que al proporcionar el perfil metabólico de un microorganismo desconocido, esto puede facilitar el diseño y evaluación de medios de cultivo específicos para el aislamiento de grupos particulares que muestren cierta preferencia por uno u otro grupo de las pruebas aplicadas. Puesto que lo anterior es medido de "manera visual" y depende estrictamente de las características observables del microorganismo durante la lectura de las pruebas, esto es conocido como una caracterización "*fenotípica microbiana*" (Logan, 1994).

La caracterización fenotípica de casi cualquier microorganismo estuvo en algún momento de su historia basada en observaciones morfológicas y, aunque la morfología es todavía una característica importante para la descripción de taxones, no puede ser exclusiva debido a las mínimas diferencias morfológicas presentes entre muchos géneros (Sneath, 1957; Logan, 1994). El estudio detallado de las propiedades químicas de los distintos componentes de la pared celular microbiana complementó la información obtenida con la caracterización fenotípica y dio origen a la "*quimiotaxonomía*". La caracterización quimiotaxonómica puede definirse como la aplicación de técnicas analíticas bioquímicas

(principalmente cromatografía y métodos de separación electroforética) para el estudio de distribuciones específicas de compuestos químicos en la pared celular de las bacterias, tales como aminoácidos, proteínas, azúcares y lípidos (Logan, 1994; Uchida & Backus, 1997).

Por medio de la cromatografía en capa fina (Thin-Layer Chromatography TLC; del inglés), es posible separar y determinar los isómeros del DAP que es un componente de la pared celular. El procedimiento consiste en tomar varias colonias de la superficie del agar del medio de cultivo, realizar una hidrólisis ácida empleando ácido clorhídrico (HCl) hasta la obtención de los aminoácidos de la pared celular. En una placa de celulosa (TLC) es posible visualizar los puntos del DAP en una gama de colores que van desde el gris, verde y amarillo, junto con los isómeros del DAP. Los aminoácidos aparecen con una coloración morada o roja y migran posteriormente después de los puntos del DAP (Staneck & Roberts, 1974).

#### 1.4.2. Aspectos genotípicos de la caracterización microbiana

Empleando como "modelo" a la caracterización fenotípica descrita anteriormente, la caracterización genotípica de un microorganismo consiste en el estudio de su material genético. Actualmente y con el desarrollo de las técnicas moleculares basadas en la reacción en Cadena de la Polimerasa (**P**olymerase **C**hain **R**eaction o PCR; del inglés) éste tipo de caracterización se encuentra basado en el empleo de secuencias de ADN (Bolívar, 2004).

Debido a la probable antigüedad de la maquinaria sintetizadora de proteínas, los ARN ribosómicos son moléculas excelentes para discernir las relaciones evolutivas entre los seres vivos. Los ARN ribosómicos son funcionalmente constantes, están universalmente distribuidos y su

secuencia está moderadamente bien conservada a través de amplias distancias filogenéticas. El estudio y la comparación de secuencias ribosomales muestran la posición evolutiva más probable existente entre los organismos (Madigan *et al.*, 2004).

Existen tres moléculas de ARN ribosómico, que en procariontes tienen distintos tamaños: 5S (120 nucleótidos -nt-), 16S (1500 nt) y 23S (2900 nt). Estas moléculas contienen regiones de secuencia altamente conservada que resultan útiles para obtener alineamientos de secuencia apropiados. El gen 16S del ARN es mucho más manejable experimentalmente con respecto al gen 23S, por lo tanto se ha utilizado para el desarrollo de bases de datos para procariontes, bases de datos que inclusive son de libre acceso.

Técnicas basadas en la información genética de los microorganismos para lograr su identificación, por ejemplo, la secuenciación de su genoma o de algún gen en específico, permiten la amplificación (aumento en el número) de una secuencia definida del ADN a través de la PCR para posteriormente estudiarla. Es precisamente a partir de la obtención de un cultivo puro de un microorganismo que la técnica de PCR puede emplearse para amplificar directamente los genes que codifican el ARN ribosómico 16S.

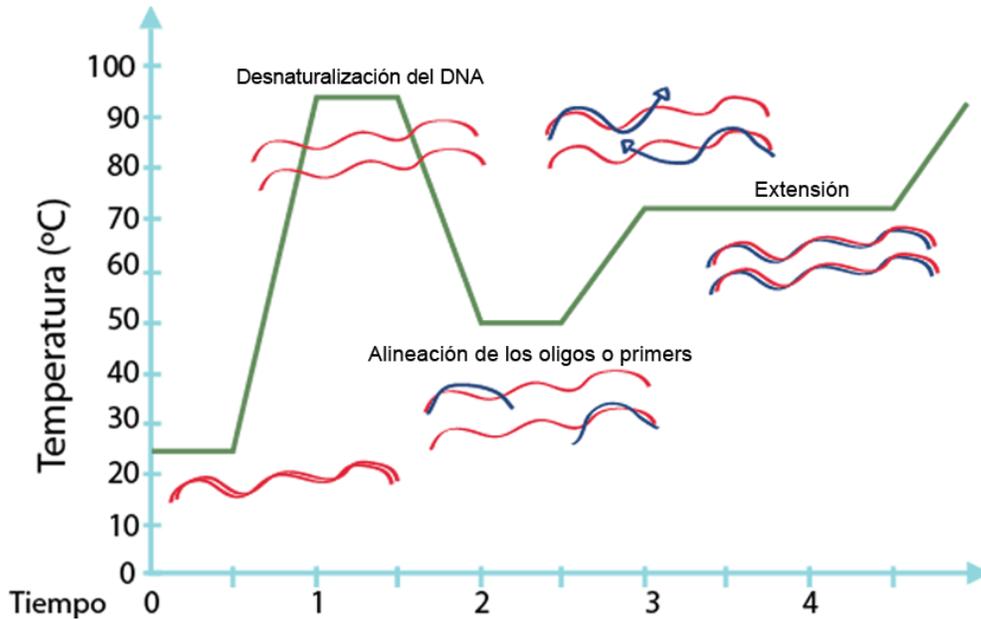
#### 1.4.2.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR fue diseñada por Kary Mullis en 1983 aunque su primera publicación fue hasta el año de 1985 (Kieser, 2000). La técnica tiene su base en la actividad de la enzima DNA polimerasa, que cuenta con la capacidad de sintetizar una nueva cadena de DNA complementaria a partir de otra ya existente. Los requisitos de la enzima para llevar a

cabo esta reacci3n son que existan nucle3t3idos en el medio (la materia base para fabricar la cadena complementaria de DNA) y una peque1a cadena de DNA que pueda unirse a la mol3cula que se requiera copiar para que sirva como cebadora o "*primer*". La t3cnica emplea m3nimas cantidades de DNA (menor a 1 µg) y consta b3sicamente de 3 pasos fundamentales divididos en varios ciclos (usualmente de 25 hasta 40) que comprende:

- Desnaturalizaci3n (95°C),
- Alineamiento (55-60°C),
- Extensi3n (72°C).

En una PCR el primer paso consiste en la *desnaturalizaci3n* del DNA por medio de calor (95°C) para casi de inmediato bajar la temperatura de modo que los extremos 3' de las hebras sean separados hasta que se puedan aparear con oligodesoxinucle3t3idos complementarios, con la respectiva formaci3n de h3bridos estables con la mol3cula que funciona como molde o plantilla. Dichos oligonucle3t3idos funcionan como *cebadores* (tambi3n conocidos como *iniciadores*, *oligonucle3t3idos* o *primers*) de modo que una polimerasa resistente a la desnaturalizaci3n por calor y usualmente la *Taq* polimerasa (aislada de la bacteria term3fila *Thermus aquaticus*) extiende los extremos 3' de ambos oligonucle3t3idos empleando las hebras del DNA bicatenario como plantilla, proceso que se conoce como *extensi3n* y que usualmente se lleva a cabo 72°C, por tratarse de la temperatura 3ptima de la *Taq* polimerasa.



**Figura 7.** Gráfica de la PCR.

Una segunda desnaturalización pone fin a un *ciclo* (los 3 pasos indicados previamente) y da comienzo al siguiente. De esta forma, al término del primer ciclo de reacción se obtienen dos copias idénticas bicatenarias del DNA original. Cada ciclo se repite alrededor de 25 a 40 veces, sin la adición de más enzimas o reactivos y empleando las moléculas obtenidas en el ciclo anterior como molde o plantilla. De esta manera se produce un aumento exponencial del número de copias de la secuencia específica equivalente a  $2^n$ , donde  $n$  representa el número de ciclos. Al término de todos los ciclos, la muestra se enfría a 4°C para su conservación y posterior análisis usualmente por electroforesis horizontal o submarina.

Para realizar la técnica de PCR se requieren los siguientes reactivos (Newton & Graham 1997):

- Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), provee de nucleótidos (Adenina, Guanina, Citosina y Timina) a la reacción para la síntesis de DNA.
- Oligonucleótidos, secuencias cortas (normalmente de 18 a 22 nucleótidos) que se emplean para iniciar la reacción y actúan como secuencias complementarias a las dos hebras de DNA.
- Iones Magnesio ( $Mg^{2+}$ ), una concentración óptima de cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), es requerida para la actividad y fidelidad de la enzima DNA polimerasa.
- Buffer, mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la DNA polimerasa.
- DNA (*Taq*) polimerasa, cataliza la síntesis de la cadena complementaria a partir del DNA molde.
- DNA molde, es la muestra que se desea amplificar.
- Termociclador, aparato que va a mantener la temperatura necesaria en cada paso del ciclo de la PCR.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los representantes más importantes de la clase *Actinobacteria*, el género *Streptomyces*, se caracteriza por la producción de metabolitos secundarios, que son moléculas farmacológicamente activas, por lo que su estudio es fundamental. Dada la aparición cada vez más usual de cepas de importancia clínica multiresistentes a los antimicrobianos más empleados en medicina.

Debido a que México es un país megadiverso y por consecuencia microbiológicamente también lo es, es necesario el estudio de posibles nuevas especies de *Streptomyces* aisladas de ambientes nacionales, debido a que estas posibles nuevas especies pudieran ser fuente de nuevos compuestos antimicrobianos. Es necesaria la evaluación de un medio de cultivo que favorezca u oriente la caracterización macroscópica de *Streptomyces* dando sustento a que esa caracterización pudiera estar implicando el estudio de nuevas especies de origen nacional.

La caracterización de nuevos estreptomicetos ha sido tradicionalmente realizada a partir del medio ISP-3 pero el crecimiento óptimo en este medio no es una constante de todas las especies. Nuevas alternativas que puedan contribuir también para una caracterización confiable de *Streptomyces*, por ejemplo un medio a base de arroz, representa una posibilidad viable mediante la comparación de ciertas características de crecimiento y producción de pigmento, de dichos microorganismos en el agar avena y un agar a base de arroz, que es lo que se prueba en este trabajo.

### 3. OBJETIVOS

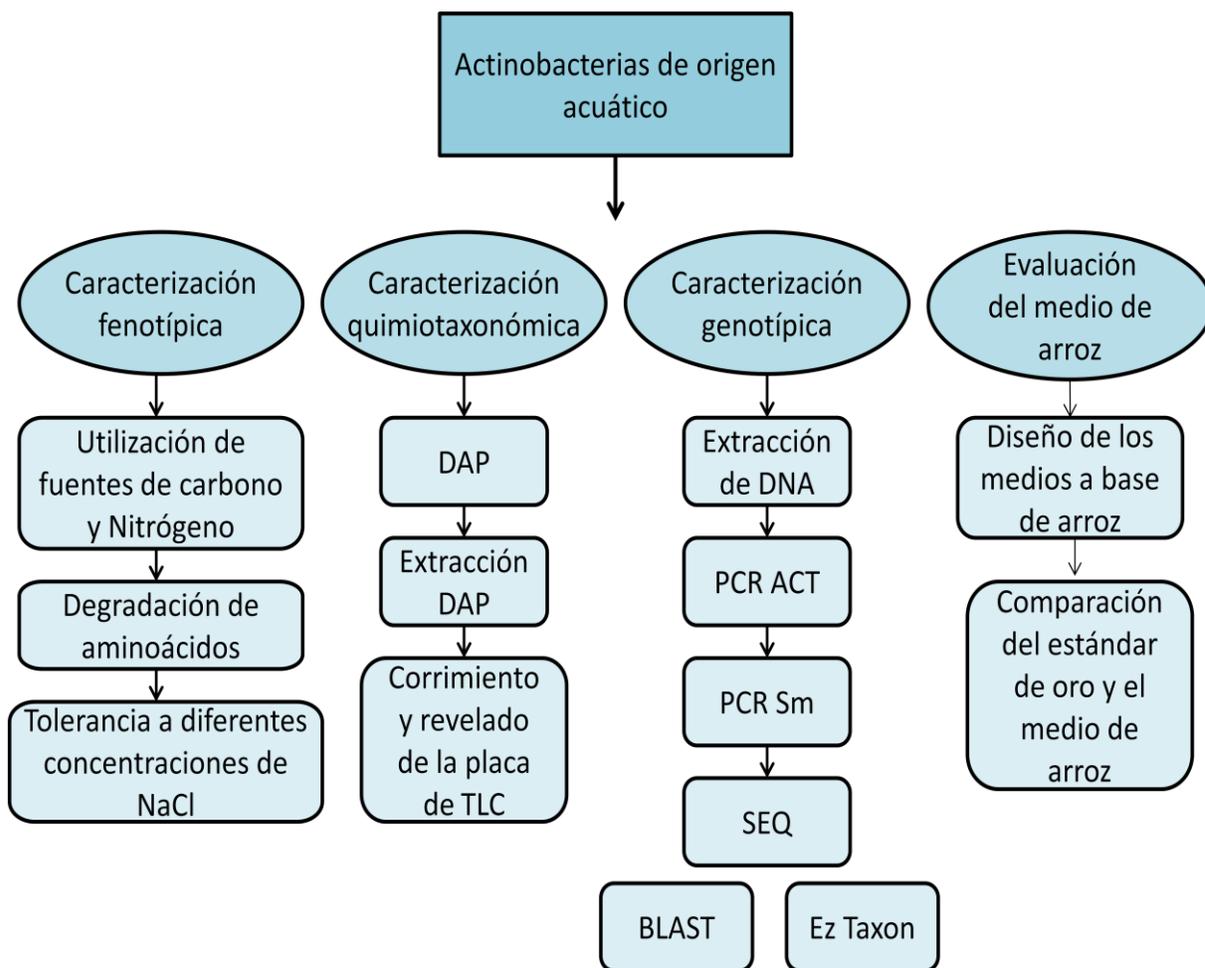
- Caracterizar geno- y quimiotaxonómicamente aislados nacionales para identificarlos como miembros del género *Streptomyces*.
- Caracterizar fenotípicamente aislados nacionales con base en sus características primarias de crecimiento del género *Streptomyces*.
- Evaluar un medio de cultivo a base de arroz y compararlo con el agar de avena (estándar de oro), para identificar la caracterización fenotípica de *Streptomyces* respecto a sus características de crecimiento y producción de pigmento.

### 4. HIPÓTESIS

Si las características de crecimiento y la producción de pigmento, son cualidades que describen al género *Streptomyces*, pueden ser un punto de comparación para determinar el efecto que produce un nuevo medio de cultivo. Con el agar arroz se espera encontrar un medio de cultivo donde el crecimiento óptimo sea constante en la mayoría de las especies de *Streptomyces* y se mejore la expresión de las características, comparándolas con el estándar de oro.

## 5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

El diseño experimental de este trabajo está esquematizado en términos generales en el siguiente diagrama de flujo (Figura 8):



**Figura 8.** Diseño experimental.

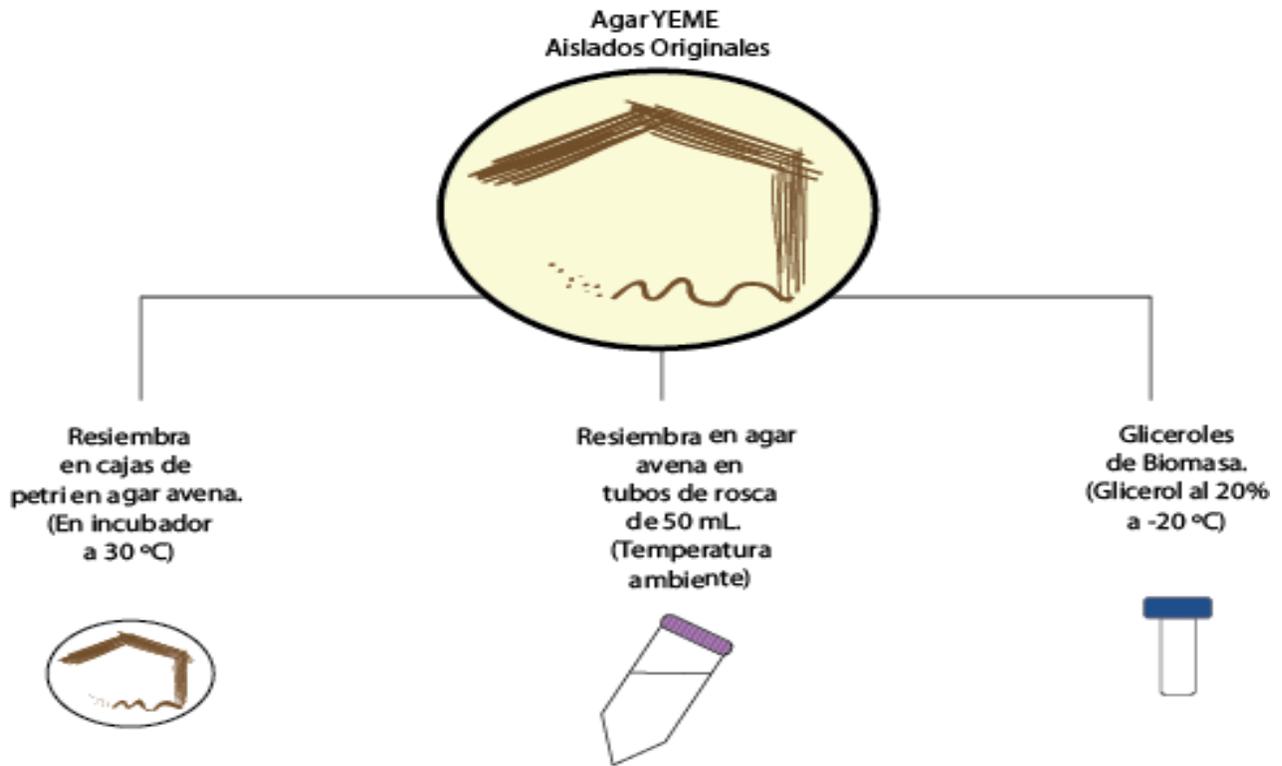
### 5.1. Actinobacterias de origen acuático

Se trabajaron 12 cepas de aislados provenientes de muestras acuáticas nacionales. Todos los microorganismos excepto la cepa Emma-6-12 fueron obtenidos de sedimentos marinos del Golfo de California recolectados durante la campaña oceanográfica de Febrero del 2006. El aislado Emma-6-12 fue recuperado de una muestra terrestre en el sureste del país durante una práctica de campo por estudiantes de Estancias de investigación en el 2009. Se incluyeron 2 cepas de referencia una de ellas, *S. griseus* obtenida del cepario de la Facultad de Química, Ciudad Universitaria y *S. yatensis* donada por la Dra. Danielle Saintpierre (Nueva Caledonia, Francia). Los códigos de los microorganismos de trabajo se indican en las tablas 2 y 3.

**Tablas 2 y 3.** Relación de los microorganismos aislados (izquierda) y controles (derecha).

Aislados	Aislados	Controles
9(13)	f(12)	<i>S.griseus</i>
ae(4)	HAR-17	<i>S. yatensis</i>
AK-1	HAR-18	
AL-2	OAG-B1	
e(23)	OAG-G1	
Emma-6-12	P5	

Para todo el desarrollo experimental de este trabajo, se cultivaron y se activaron resembrando los microorganismos en: cajas Petri con agar avena para trabajo inmediato. Se mantuvieron las muestras en: (a) tubos con medio en pico de flauta de 50mL para una conservación de 6 a 8 meses (experimentos a mediano plazo) y (b) glicerol al 20% para una conservación de años, experimentos a largo plazo (Figura 9).



**Figura 9.** Activación y conservación de los microorganismos de estudio.

## 5.2. Caracterización fenotípica

### 5.2.1. Utilización de fuentes de carbono y nitrógeno

Se evaluó el crecimiento de los microorganismos en 25 fuentes de carbono y 14 fuentes de nitrógeno (Tablas 4 y 5, respectivamente).

**Tabla 4.** Fuentes de carbono seleccionadas para la caracterización fenotípica (concentración final de cada fuente de carbono: 1.0%).

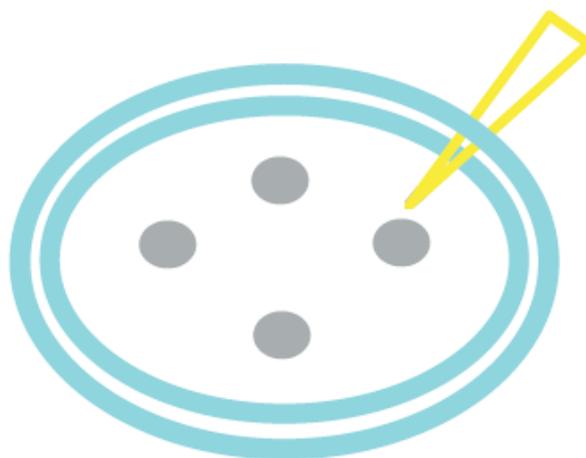
Fuentes de Carbono					
Pectina	Ác. Pirúvico	Manosa	Melobiosa	Rafinosa	Galactosa
Dulcitol	Manitol	Arabinosa	Lactosa	Sacarosa	Melezitosa
Xilosa	Xilitol	Inositol	Ac. Oxálico	Sorbitol	Fructosa
Andonitol	Maltosa	Trehalosa	Ác. Succínico	Ramnosa	Celobiosa
Ác. Malónico					

**Tabla 5.** Fuentes de nitrógeno seleccionadas para la caracterización fenotípica (concentración final de cada fuente de nitrógeno: 0.1%).

<b>Fuentes de Nitrógeno</b>				
Histidina	Ornitidina	Arginina	Triptofano	Valina
Alanina	Metionina	Prolina	Fenilalanina	Isoleucina
Serina	Ác. Aspártico	Leucina	Ác. Glutámico	

1. Para la preparación de los medios de cultivo se pesó 1g de las fuentes de carbono y 0.1g de las fuentes de nitrógeno y ambas se disolvieron en 40mL de agua bidestilada.
2. Por separado, se prepararon los medios ISP-9 y el medio basal para las fuentes de carbono y de nitrógeno, respectivamente (Shirling y Gottlieb, 1966; Anexos).
3. Los dos medios de cultivo que sirvieron como base de la prueba se esterilizaron en autoclave a 1 atm de presión, a 121°C durante 15 minutos.
4. Las fuentes de carbono y nitrógeno se tinalizaron en autoclave a 1 atm, a 110°C durante 30 minutos, cada 24 horas y durante 3 días consecutivos.
5. Una vez esterilizados y tinalizados ambos componentes respectivamente, se dejaron enfriar aproximadamente a 45°C y se mezclaron individualmente antes de verter en cajas Petri de plástico estériles.
6. Para inocular las cajas, se prepararon suspensiones de cada microorganismo: se transfirieron de 4 a 5 asadas de biomasa a

750 $\mu$ L de Solución Salina Isotónica (SSI 0.9%) estéril. Todas las suspensiones de biomasa se estandarizaron y homogeneizaron para llegar a un valor de 3 en la escala del estándar de McFarland. Las cajas Petri se inocularon con 15 $\mu$ L de muestra como se indica en la figura 10.



**Figura 10.** Forma de inoculación de los microorganismos en las cajas de Petri.

7. Las cajas de Petri ya inoculadas e identificadas perfectamente, se incubaron a 30°C durante 7 días y el crecimiento de los microorganismos se registró a los 7, 14 y 21 días.

La ponderación de los valores presentados en los resultados de la caracterización fenotípica se basó en el crecimiento y utilización de cada una de las fuentes de carbono y nitrógeno. Se indicó ausencia de crecimiento así como de utilización con (-) y la presencia con (++++) si éste fue excelente, con diferentes rangos de desarrollo y utilización entre los extremos. El medio que contenía glucosa funcionó como control positivo de fuentes de carbono para establecer el rango mencionado mientras que no se emplea ningún medio con fuente de nitrógeno como control positivo sino solamente un medio que contiene agua como control negativo.

### 5.2.2. Pruebas de degradación

1. Empleando el medio GYEA como base, se agregó a 100mL de dicho medio el compuesto por degradar (0.5g ó 0.4g) previo a su esterilización en autoclave a 1 atm de presión, a 121°C durante 15 minutos (los compuestos y las concentraciones finales empleadas en las pruebas de degradación se indican en la Tabla 6).

**Tabla 6.** Compuestos empleados para las pruebas de degradación

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

2. Después de la esterilización y cuando la temperatura del medio bajó a alrededor de 45°C, éste se vertió en cajas Petri para posteriormente ser inoculado con los microorganismos de estudio.
3. Para inocular las cajas, se prepararon suspensiones de cada microorganismo, mediante transferencia de 4 a 5 asadas de biomasa (7 días de crecimiento en GYEA, a 30°C) a 750µL de Solución Salina Isotónica (SSI 0.9%) estéril. Todas las suspensiones se estandarizaron y homogeneizaron para llegar a un valor de 3 en la escala del estándar de McFarland. Se inoculó con 10µL de muestra de la misma forma como se indicó en la sección previa.

4. Las cajas de Petri ya inoculadas e identificadas perfectamente, se incubaron a 30°C y la degradación de los distintos compuestos se registró a los 7, 14 y 21 días.

### 5.2.3. Tolerancia a diferentes concentraciones de Cloruro de Sodio (NaCl)

1. La capacidad de los aislados para tolerar diferentes concentraciones de NaCl se evaluó en el medio Bennett's modificado como medio basal al cual se le agregaron diferentes concentraciones de NaCl: 0, 10, 15, 20 y 30%.
2. Para inocular las cajas, se prepararon suspensiones de biomasas de cada microorganismo, como se indicó en la sección anterior. Se inoculó con 15µL de muestra, extendiéndola con el asa para sembrar por el método de agotamiento.
3. Las cajas de Petri ya inoculadas e identificadas perfectamente, se incubaron a 30°C durante 7 días y el crecimiento de los microorganismos se registró a los 7, 14 y 21 días.

La ponderación de los valores presentados en los resultados de la tolerancia a diferentes concentraciones de sal, se basó principalmente en el crecimiento de cada uno de los microorganismos. Se indicó ausencia de crecimiento con (-) y la presencia con (+).

### 5.3. Caracterización quimiotaxonómica

#### 5.3.1. Ácido diaminopimérico (DAP)

Se realizó una modificación de la técnica descrita por Staneck y Roberts (1974) para la identificación de la presencia de isómeros del DAP. Esta técnica nos permite clasificar a los microorganismos en tres grandes grupos, aquellos que presentan la forma *-meso*, *OH-* o *LL* del DAP (Goodfellow *et al*, 2005).

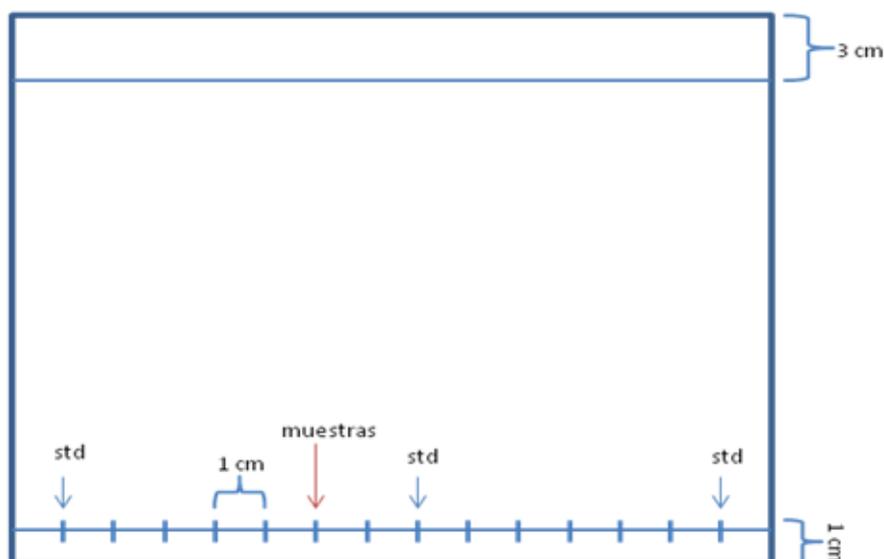
##### 5.3.1.1. Extracción de DAP

1. Se etiquetaron tubos de plástico estériles (con tapón de rosca) con la clave del microorganismo.
2. Se adicionó con una micropipeta Gilson (p1000) 500µL de HCl 6N a cada uno de los tubos etiquetados (realizado en la campana de extracción).
3. Se añadió aproximadamente 150µg de perlas de vidrio (Sigma-Aldrich 106) a cada uno de los tubos. En la campana de flujo laminar, se tomaron aproximadamente 2 asadas de biomasa del microorganismo (7 días de crecimiento en GYEA, a 30°C), con la menor cantidad posible de agar y se depositaron en el tubo correspondiente, teniendo cuidado de desechar el asa después de haber depositado la biomasa en el tubo con HCl, entre asada y asada.
4. Se cerraron perfectamente los tubos y se agitaron en el vórtex (Daigger, EUA) por 5 minutos.

5. Se colocaron los tubos en una gradilla de metal dentro de un horno de convección previamente ajustado a 100°C durante 4 horas.
6. Transcurrido el tiempo, se sacaron los tubos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 6000 revoluciones por minutos (r.p.m) durante 5 minutos.

#### 5.3.1.2. Corrimiento y revelado de la placa TLC

1. Se marcó una placa cromatográfica de celulosa con ayuda de un lápiz y una regla, trazando una línea a 1cm desde la base y marcando sobre dicha línea puntos de 1cm de separación entre punto y punto. Cada punto corresponde a una muestra, y se colocaron 3 estándares: uno al principio, otro en medio y el último al final de la placa cromatográfica como se muestra en la figura 11.



**Figura 11.** Marcado de la placa cromatográfica de celulosa para la TLC.

2. Con una micropipeta Gilson p2, se tomó  $1\mu\text{L}$  de extracto de DAP y se colocó en la marca de la muestra correspondiente, sobre la placa cromatográfica.
3. Inmediatamente después de haber colocado la gota de extracto, ésta se secó por 5 minutos con ayuda de una secadora de pelo, evitando así que la muestra se extienda.
4. Se repitieron los pasos 2 y 3 hasta colocar  $4\mu\text{L}$  de cada muestra con excepción del estándar (Sigma-Aldrich, USA) del que solamente se colocaron  $2\mu\text{L}$ .
5. Se preparó una solución de HCl 6N- Piridina-  $\text{H}_2\text{O}$ - MeOH (2:5:13:40, v/v) que corresponde a la fase móvil y se depositó en un tanque de revelado. Se introdujo la placa cromatográfica dentro del tanque, teniendo cuidado de que la fase móvil no tocara las muestras al momento de introducir dicha placa y

procurando que el tanque estuviera lo más vertical posible para permitir que las muestras corrieran uniformemente.

6. Una vez que la fase móvil llegó casi al extremo superior de la placa (aproximadamente 2cm de distancia), se retiró la placa del tanque y se le dejó secar en la campana de extracción por aproximadamente 30 minutos.
7. Se roció la placa TLC con una solución de Ninhidrina (0.2% v/v) disuelta en EtOH al 100%, se dejó secar en la campana de extracción.
8. Se colocó la placa TLC en una parrilla de revelado CAMAG, previamente ajustada a 100°C durante 3-5 minutos. Se observó la placa y se registró la posición de los isómeros de ácido diaminopimérico de cada muestra, comparando contra los resultados de los estándares.

#### **5.4. Caracterización genotípica**

##### 5.4.1. Extracción de DNA

1. En un tubo Eppendorf (1.5mL) se colocó aproximadamente 100µL de perlas de vidrio (Sigma-Aldrich, EUA) y 500µL buffer Glucosa-Tris-EDTA (GTE).
2. Se tomaron de 2 a 3 asadas de biomasa de cada uno de los microorganismos de estudio (7 días de crecimiento en medio Non-Sporulating agar o NA, a 30°C) con asas bacteriológicas desechables estériles (Sigma-Aldrich, EUA) y se colocaron en cada

uno de los tubos Eppendorf preparados en el paso (1). Se colocaron los tubos en el refrigerador durante 12 horas.

3. Se retiraron los tubos del refrigerador y se aplicó un tratamiento de agitación constante en Vórtex (Daigger, EUA) a velocidad máxima durante 15 minutos.
4. Se centrifugaron los tubos a 14000 r.p.m durante 15 minutos. Transfiriendo el sobrenadante (entre 300-400 $\mu$ L) a un nuevo tubo Eppendorf (1.5mL) estéril.
5. Se adicionó al tubo Eppendorf el mismo volumen de Fenol-Cloroformo-Alcohol iso-amílico (24:24:1 v/v; Sigma-Aldrich, EUA). Agitando brevemente (3-5 segundos) en Vórtex (Daigger, EUA) cada uno de los tubos.
6. Se centrifugaron los tubos a 14000 r.p.m durante 12 minutos. Se repitieron los pasos 4 y 5.
7. Transfirió el sobrenadante (DNA en solución) a un nuevo tubo Eppendorf (1.5mL) estéril (aproximadamente 250-300 $\mu$ L). Se adicionó etanol frío (EtOH, Sigma-Aldrich, EUA) al 100% a una relación 2:1 v/v.
8. Se centrifugó a 14000 r.p.m durante 15 minutos. Se decantó el sobrenadante evitando que se saliera la pastilla formada.
9. Se lavó la pastilla con 300-500 $\mu$ L de etanol al 70% (EtOH, Sigma-Aldrich, EUA) a temperatura ambiente. Y se resuspendió varias

veces la pastilla con ayuda de una micropipeta (Gilson, 0-200 $\mu$ L) evitando que la pastilla pasara por la punta.

10. Se centrifugó a 14000 r.p.m durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y se invirtió cada uno de los tubos sobre papel absorbente aproximadamente por 12 en la campana de extracción.
11. Se reconstituyó la pastilla (DNA) en 70 $\mu$ L de buffer 1xTris-EDTA (TE). Los tubos se colocaron con la tapa cerrada en un block-heater a 55°C por 1 hora.
12. Se guardaron los tubos en el refrigerador hasta ser utilizados para la electroforesis en agarosa al 1% para verificar que la extracción haya sido exitosa confirmando la presencia del producto, y para la PCR.

5.4.2. PCR

Para la amplificación del DNA a través de la PCR se emplearon los siguientes primers específicos para identificar la clase *Actinobacteria* se utilizó el primer "Act" (Sigma-Aldrich, EUA) y para *Streptomyces* el primer "Sm" (Sigma-Aldrich, EUA) (Maldonado *et al*, 2005; Tablas 7 y 8):

**Tabla 7.** Par de primers utilizados en la PCR Act.

<b>Act</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>	<b>Fragmento amplificado (pb)</b>
Act254	CGCGGCCTATCAGCTTGTTG	640
Act894	CCGTACTCCCCAGGCGGGG	

**Tabla 8.** Par de primers utilizados en la PCR Sm.

<b>Sm</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>	<b>Fragmento amplificado (pb)</b>
Sm6F	GGTGGCGAAGGCGGA	600
Sm5R	GAAGTGAAGACCGGCTTTTGA	

1. A un tubo Eppendorf de 0.2mL se agregaron: el buffer de amonio (10X y pH 8.8; Bioline, EUA), MgCl<sub>2</sub> (50mM; Bioline, EUA), dNTP's (100 mM; Bioline, EUA), primers (20 μM; Sigma-Aldrich, EUA), *Taq* Pol (5 u/μL; Bioline, EUA), DNA de cada muestra y agua para PCR necesario para llevar a un volumen final de 20 μL. En el control negativo se sustituyó la misma cantidad de DNA por agua para PCR.

**Tabla 9.** Cantidades utilizadas para cada PCR, en cada tubo Eppendorf de 0.2mL.

<b>Reactivo</b>	<b>PCR Act</b>	<b>PCR Sm</b>
<b>Buffer 10X NH<sub>4</sub> (μL)</b>	2.0	2.0
<b>MgCl<sub>2</sub> (μL)</b>	0.6	0.6
<b>dNTP's (μL)</b>	0.5	0.5
<b>Primers (μL)</b>	0.2	0.4
<b>Taq Pol (μL)</b>	0.04	0.04
<b>DNA (μL)</b>	0.4	0.4
<b>Agua para PCR (μL)</b>	15.26	15.26
<b>Total</b>	20	20

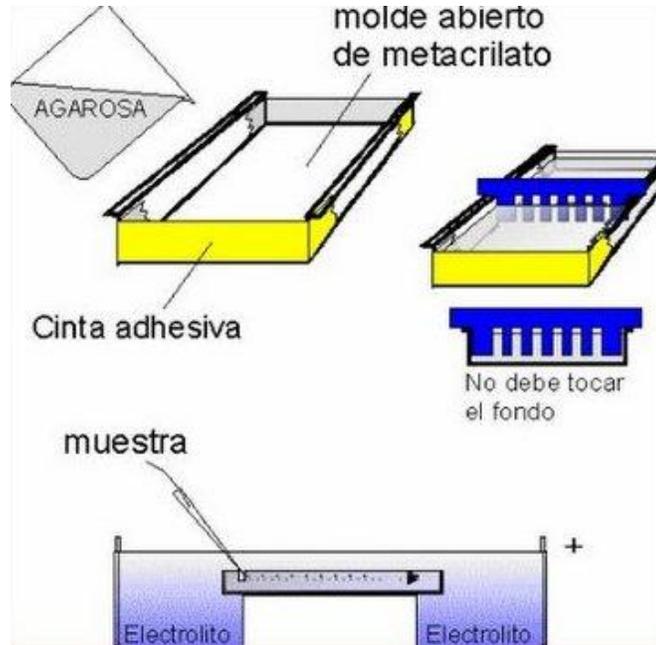
2. Cada tubo se colocó en el Termociclador (MULTIGENE II Labnet) durante 35 ciclos bajo las siguientes condiciones: 94°C por un minuto, 60°C por un minuto, 72°C por un minuto y una extensión final (72°C) por diez minutos. El producto de PCR de cada muestra se examinó por medio de una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%.

#### 5.4.3. Electroforesis horizontal, agarosa al 1%

Los productos amplificados fueron separados a través de electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1%. A continuación se detalla el procedimiento realizado:

1. A un matraz Erlenmeyer se adicionó 1g de agarosa al cual se le agregaron 100mL de Buffer TBE 0.5X (Tris-Borato-EDTA), que se calentó en un horno de microondas hasta su completa disolución.

2. Un vez disuelto se agregó 1 $\mu$ L de Bromuro de Etidio (Sigma-Aldrich, EUA) agitándose suavemente para homogeneizar la mezcla.
3. Se decantó la mezcla en una charola de plástico para electroforesis a la cual previamente se habían colocado los peines que tienen como finalidad formar los pozos en el gel (Figura 12).
4. El gel se dejó enfriar a temperatura ambiente dentro de una campana de extracción hasta su completa gelificación (aproximadamente 30-45 minutos).
5. La cámara para electroforesis se llenó con buffer TBE 0.5X y se sumergió el gel retirando los peines, permitiendo así que los pozos se llenaran con el buffer indicado.
6. Para cargar el gel con las muestras se mezclaron 4 $\mu$ L del producto de PCR con 4 $\mu$ L de buffer de carga, homogenizando y aplicando esta mezcla en cada uno de los pozos correspondientes en el gel de agarosa. Al principio y al final de las muestras (pozos en los extremos del gel) se agregaron 0.5 $\mu$ L de marcador de peso molecular (1000 pares de bases; Bioline, EUA).
7. Posteriormente se colocó la tapa de la cámara y se conectaron los electrodos, dejando correr durante 40 minutos con una diferencia de potencial de 70 Volts.



**Figura 12.** Procedimiento que muestra los distintos pasos para el vertido del gel de agarosa en la cámara de electroforesis horizontal y la colocación de la muestra en los pozos.

- Una vez transcurrido el tiempo se transfirió el gel a un transiluminador (Ultra Violet Products, EUA) para visualizar las bandas obtenidas y por medio de un fotodocumentador (Probiotek, México) se capturó la imagen en una memoria para posteriormente transferirla a una computadora e imprimirla.

#### 5.4.4. Secuenciamiento del producto de PCR

Se realizó un último PCR empleando los primers sugeridos por Lane (1991) 27f y 1525r que amplifican casi en su totalidad el gen ARN 16S. Las condiciones y la realización fueron las mismas mencionadas previamente pero en un volumen final de reacción de 50 microlitos. Después de revisar cada producto de PCR, éstos se purificaron utilizando

el QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Ltd, Alemania) de acuerdo a las indicaciones e instrucciones del fabricante. Los productos purificados fueron analizados nuevamente en una electroforesis horizontal en gel de agarosa para confirmar la presencia del producto y estimar su concentración por comparación contra un marcador de peso molecular de concentración conocida. Esta electroforesis se realizó como se describió previamente para las electroforesis horizontales de ADN y productos de PCR en los incisos anteriores. Los productos purificados se conservaron a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta llevarse al Instituto de Biología de la UNAM para su procesamiento de acuerdo a las indicaciones de la M. en C. Laura Márquez Valdelamar, responsable del laboratorio de Biología Molecular de dicho Instituto.

#### 5.4.5. BLAST y Ez Taxon

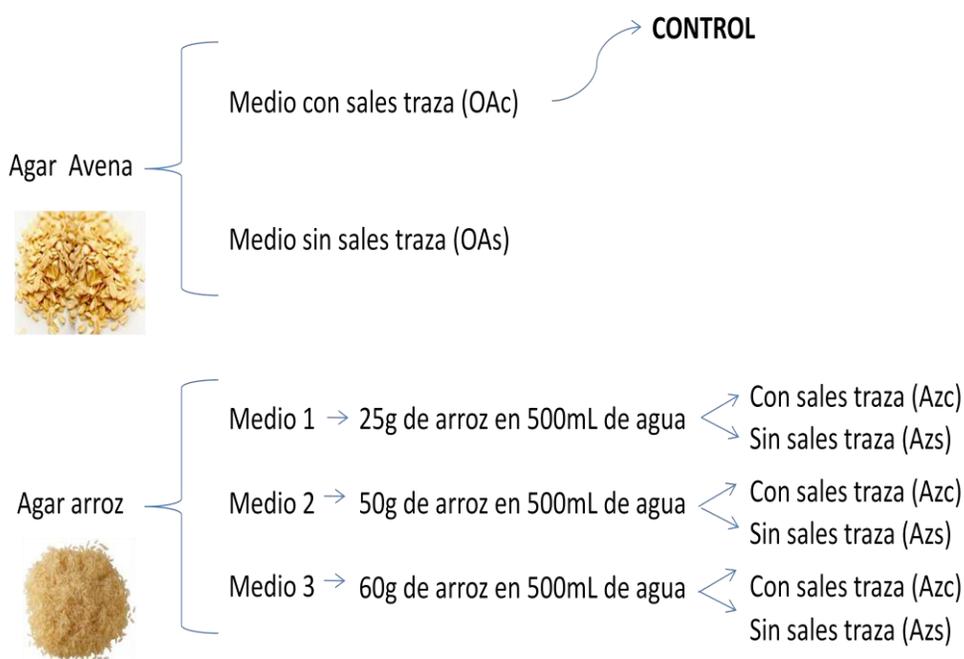
1. Las secuencias obtenidas en el Instituto de Biología fueron enviadas en archivos de formato ZIP por correo electrónico los cuales al descomprimirse mostraban las secuencias resultantes en formato ABI. Los archivos en formato ABI se leyeron con el Software Chromas Lite Versión 2.01 (Technelysium Pty Ltd, Australia) y el texto de las secuencias se exportó en formato de Texto al procesador de textos Word 2003 (Microsoft Corp, EUA). El texto correspondiente a cada una de las secuencias obtenidas se analizó en dos sitios distintos: (a) NCBI-GenBank (National Center for Biotechnology Information, por sus siglas en inglés); (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) bajo la opción BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) y (b) Ez Taxon-e (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net>; Chun *et al*, 2007). En ambos casos los resultados se registran en forma de tabla.

### 5.5. Evaluación del medio de arroz

Una vez confirmada la identidad de los aislados y realizada su caracterización, se evaluaron los 12 aislados en el medio de arroz como se detalla a continuación.

Se realizó un experimento cualitativo por comparación, es decir, se compararon dos medios, los cuales tiene como base dos diferentes cereales que representan una fuente rica en carbohidratos, en ambos casos, almidón. De estos dos medios, se realizaron variantes tanto de la composición del medio, como de la concentración, esquematizado en términos generales en el siguiente diagrama de flujo y tabla (Figura 13 y tabla 14).

#### 1. Preparación de medios:



**Figura 13.** Composición de los diferentes medios de cultivo que se evaluaron.

**Tabla 10.** Claves de los medios de cultivo.

MEDIO	COMPOSICIÓN	CLAVES
AVENA	Con sales traz	OAc
	Sin sales traza	OAs
ARROZ	25g de arroz con sales traza	Med 1 Azc
	25g de arroz sin sales traza	Med 1 Azs
	50g de arroz con sales traza	Med 2 Azc
	50g de arroz sin sales traza	Med 2 Azs
	60g de arroz con sales traza	Med 3 Azc
	60g de arroz sin sales traza	Med 3 Azs

- Se evaluaron los 10 aislados identificados como *Streptomyces* y las dos cepas de referencia. Para inocular las cajas, se prepararon suspensiones de cada microorganismo, como se describió anteriormente.

Las cajas de Petri ya inoculadas e identificadas perfectamente, se incubaron a 30°C durante 7 días y el crecimiento de los microorganismos se registró a los 7, 14 y 21 días.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Caracterización fenotípica

#### 6.1.1. Utilización de fuentes de carbono y de nitrógeno

##### 6.1.1.1. Fuentes de carbono

Los resultados de la utilización de las fuentes de carbono por parte de los 14 microorganismos se muestran en las tablas 11, 12, 13 y 14 así como en la figura 15.

Con el empleo de un control positivo (glucosa) y un control negativo (agua; sin fuente de carbono), se determinaron las fuentes de carbono empleadas por los microorganismos del presente trabajo de investigación, tanto por el crecimiento como por la utilización de varias fuentes; esto se determinó por la velocidad de crecimiento, por la producción de micelio aéreo y de pigmentos. Los resultados del empleo de las fuentes de carbono muestran algunas tendencias que se describen en las tablas antes mencionadas y se observa gráficamente en los Anexos en el apartado 10.3.

Las fuentes de carbono incluyeron: monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, polisacáridos, ácidos dicarboxílicos, alcoholes y polioles.

Los aislados HAR-17, HAR-18, AK-1 y 9(13) tuvieron un crecimiento en el rango de excelente en la mayoría de las fuentes de carbono. Los microorganismos AL-2, P5, f(12), ae(4), e(23), *S.yatensis* y *S. griseus* tuvieron un crecimiento en el rango de bueno en la mayoría de las fuentes de carbono. Los aislados OAG-G1, OAG-B1 y Emma-6-12

tuvieron un crecimiento en el rango de regular en la mayoría de las fuentes de carbono.

Los aislados HAR-17 y HAR-18, tuvieron el mismo patrón de utilización de fuentes de carbono, empleando: pectina, manosa, galactosa, manitol, arabinosa, xilosa, fructosa, maltosa, trehalosa y celobiosa.

El aislado 9(13), tuvo utilización de 11 fuentes de carbono como: pectina, manosa, galactosa, manitol, arabinosa, xilosa, fructosa, maltosa, trehalosa, ramnosa y celobiosa. El aislado AK-1 tuvo el mismo patrón de utilización que 9(13) y además adonitol. Cabe mencionar que fue el único aislado que creció en esta fuente de carbono.

Los estreptomicetos AL-2, P5, f(12), ae(4), e(23), *S. yatensis* y *S. griseus*, tuvieron un patrón similar de utilización de fuentes de carbono: manosa, galactosa, xilosa, fructosa, maltosa, trehalosa y celobiosa. Además de los anteriores, el aislado AL-2 también utilizó: pectina, melobiosa, sacarosa y ramnosa; el aislado P5 crece en: pectina, melobiosa, arabinosa, lactosa, sacarosa y ramnosa; el aislado f(12) crece en: pectina, manitol y arabinosa. El microorganismo *S. yatensis* crece en rafinosa e inositol siendo el único que creció en esas fuentes de carbono.

Los aislados que tuvieron una utilización muy pobre de las fuentes de carbono fueron OAG-B1 y OAG-G1. El primero solamente utiliza manitol y celobiosa mientras que el segundo sacarosa, melezitosa, xilosa, sorbitol, trehalosa y ramnosa.

El crecimiento de los microorganismos en los medio de cultivo adicionados con fuentes de carbono fue muy variado sin encontrarse un único patrón, lo que sugiere la posibilidad de que todos ellos sean especies diferentes entre sí.

En general hubo un excelente crecimiento y utilización en los medios con pectina, manosa, galactosa, manitol y xilosa. También hubo un buen crecimiento y utilización de arabinosa, fructuosa, maltosa, trehalosa, ramnosa y celobiosa. Los compuestos antes mencionados tienen estructuras variadas como monosacáridos, disacáridos y polisacáridos como la pectina. Lo anterior es de esperarse ya que el género *Streptomyces* tiene vías metabólicas complejas, es por eso que tiene un buen crecimiento en medios con gran cantidad de carbohidratos.

Ninguno de los aislados presentó crecimiento ni desarrolló colonias en los medios que contenían como única fuente de carbono a la serie de ácidos evaluados, es decir ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido succínico y ácido malónico. Esto pudiera ser debido a que son ácidos dicarboxílicos, compuestos por dos grupos funcionales tipo carboxilo, lo que los hace estructuras complejas y que nos indica que ningún aislado tiene rutas metabólicas que les permitan emplearlos como fuente de carbono.

**Tabla 11.** Crecimiento en fuentes de carbono a 7 días de incubación (muestras representativas).

Microorganismo	Fuentes de carbono									
	Control (+)	Control (-)	Pectina	Manosa	Dulcitol	Lactosa	Ac. Oxálico	Sorbitol	Fructosa	Celobiosa
HAR-17	+++	+	+++	++++	+	+	-	+	+++	+++
HAR-18	+++	+	+++	++++	+	+	-	+	+++	+++
AK-1	+++	+	+++	++++	+	+	-	+	+++	++++
9(13)	+++	+	+++	++++	+	+	-	+	++	+++
OAG-B1	+	+	+	+	+	+	-	+	+	++
<i>S. yatensis</i>	++	+	+++	+++	+	+++	-	+	++	+++
AL-2	++	+	+++	+++	+	+	-	+	++	+++
P5	+++	+	+++	+++	+	++	-	+	+++	+++
<i>S. griseus</i>	+++	+	+	++++	+	+	-	+	+++	+++
f(12)	+++	+	++	+++	+	+	-	+	+++	+++
ae(4)	+++	+	++	+++	+	+	-	+	++	+++
OAG-G1	+	+	+	+	+	+	-	++	+	+
e(23)	++	+	++	+++	+	+	-	++	++	+
Emma-6-12	++	+	+	+++	+	++	-	++	++	++

++++: Excelente crecimiento

+++ : Buen crecimiento

++ : Crecimiento regular

+ : Crecimiento pobre

- : Sin crecimiento

**Tabla 12.** Utilización de fuentes de carbono a 7 días de incubación (muestras representativas).

Microorganismo	Fuentes de carbono									
	Control (+)	Control (-)	Pectina	Manosa	Dulcitol	Lactosa	Ac. Oxálico	Sorbitol	Fructosa	Celobiosa
HAR-17	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
HAR-18	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
AK-1	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
9(13)	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
OAG-B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>S. yatusis</i>	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
AL-2	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
P5	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
<i>S. griseus</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
f(12)	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
ae(4)	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
OAG-G1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
e(23)	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
Emma-6-12	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+

+: Utilización de la fuente de carbono

-: Sin utilización de la fuente de carbono

**Tabla 13.** Crecimiento en fuentes de carbono a 14 días de incubación (muestras representativas).

Microorganismo	Fuentes de carbono									
	Control (+)	Control (-)	Pectina	Manosa	Dulcitol	Lactosa	Ac. Oxálico	Sorbitol	Fructosa	Celobiosa
HAR-17	+++	+	++++	++++	+	+	-	+	+++	+++
HAR-18	+++	+	++++	++++	+	++	-	+	+++	+++
AK-1	+++	+	++++	++++	+	+	-	+	+++	++++
9(13)	+++	+	++++	++++	+	+	-	+	+++	+++
OAG-B1	++	+	+	++	+	++	-	++	++	+++
<i>S. yatusi</i>	++	+	+++	+++	+	+++	-	+	++	+++
AL-2	++	+	+++	+++	+	++	-	+	++	+++
P5	+++	+	+++	+++	+	++	-	+	+++	+++
<i>S. griseus</i>	+++	+	++	++++	+	+++	-	+	+++	+++
f(12)	+++	+	++	+++	+	++	-	+	+++	+++
ae(4)	+++	+	+++	+++	+	+++	-	++++	+++	+++
OAG-G1	++	+	+	++	+	++	-	++	++	+
e(23)	+++	+	++	+++	+	+	-	++	+++	+
Emma-6-12	++	+	++	+++	+	++	-	++	++	++

++++: Excelente crecimiento

+++ : Buen crecimiento

++ : Crecimiento regular

+ : Crecimiento pobre

- : Sin crecimiento

**Tabla 14.** Utilización de fuentes de carbono a 14 días de incubación (muestras representativas).

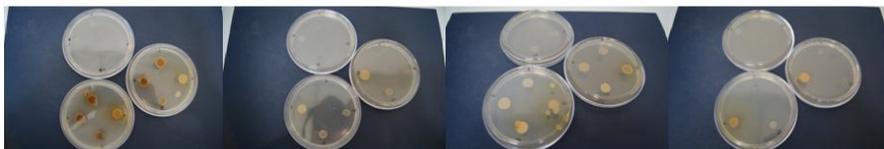
Microorganismo	Fuentes de carbono									
	Control (+)	Control (-)	Pectina	Manosa	Dulcitol	Lactosa	Ac. Oxálico	Sorbitol	Fructosa	Celobiosa
HAR-17	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
HAR-18	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
AK-1	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
9(13)	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
OAG-B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>S. yatusensis</i>	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
AL-2	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
P5	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
<i>S. griseus</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
f(12)	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
ae(4)	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
OAG-G1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
e(23)	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
Emma-6-12	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+

+: Utilización de la fuente de carbono

-: Sin utilización de la fuente de carbono

Manosa

7 días, anverso de la caja Petri



14 días, anverso de la caja Petri



14 días, reverso de la caja Petri



Sorbitol

7 días, anverso de la caja Petri



14 días, anverso de la caja Petri

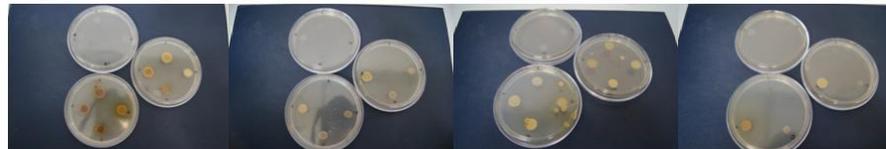


14 días, reverso de la caja Petri

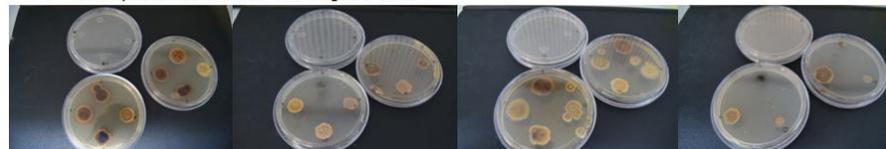


Fructuosa

7 días, anverso de la caja Petri



14 días, anverso de la caja Petri

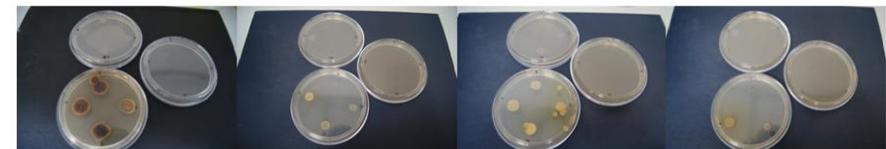


14 días, reverso de la caja Petri

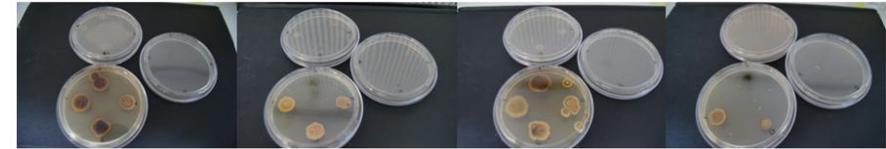


Ác. oxálico

7 días, anverso de la caja Petri



14 días, anverso de la caja Petri



14 días, reverso de la caja Petri



**Figura 14.** Fotografías representativas de la prueba de utilización de fuentes de carbono.

#### 6.1.1.2. Fuentes de nitrógeno

La capacidad de los catorce microorganismos para utilizar los diferentes aminoácidos como fuente de nitrógeno se ejemplifican en las tablas 15, 16, 17 y 18, y la figura 15.

Con el empleo de un control negativo (agua; sin fuente de nitrógeno), se determinaron las fuentes de nitrógeno empleadas por los microorganismos del presente trabajo de investigación. Los resultados del empleo de las fuentes de carbono muestran algunas tendencias que se describen en las tablas antes mencionadas y se observa gráficamente en los Anexos en el apartado 10.3.

Para este grupo de pruebas se emplearon como fuentes de nitrógeno 12 de los 20 aminoácidos esenciales para la formación de proteínas. Estos fueron L-ácido glutámico, L-ácido aspártico, L-alanina, L-arginina, L-fenilalanina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-prolina, L-serina, L-triptófano y L-valina. También se adicionó otra fuente; la L-ornitina que es un aminoácido dibásico.

Los aislados HAR-17, HAR-18, AK-1, ae(4) y 9(13) tuvieron unos patrones de utilización muy similares donde los cinco microorganismos utilizaron: histidina, arginina, isoleucina y serina. Ninguno de los cinco utilizó ni ornitina ni alanina.

Si bien la mayoría de los aislados tuvieron un buen crecimiento en dichos medios, hubo casos especiales que sólo utilizaron pocos aminoácidos. Por ejemplo, el aislado AL-2 y *S. griseus* solo utilizaron, histidina. El aislado P5 solo utilizó histidina y triptófano. El aislado f(12) solo utilizó histidina, valina, alanina y serina. El aislado Emma-6-12 utilizó únicamente, histidina, isoleucina y serina.

El aislado OAG-B1, creció sólo en los medios con histidina y arginina, utilizando únicamente la arginina, donde fue el único microorganismo que no utilizó la histidina.

Mientras que OAG-G1 tuvo un mejor crecimiento en los medios con fuentes de nitrógeno que con las de carbono, utilizando: histidina, arginina, prolina, isoleucina y leucina.

*Streptomyces yatensis* tuvo en general un buen crecimiento en los medios con fuentes de nitrógeno pero solo utilizó: histidina, alanina y ornitidina, donde en esta última fue el único microorganismo que creció en dicha fuente de nitrógeno.

En general hubo un excelente crecimiento y utilización en los medios con histidina, arginina, fenilalanina e isoleucina. Y hubo un buen crecimiento y utilización en los medios con triptófano, valina, alanina, prolina, serina leucina y ornitidina.

Ninguno de los aislados presentó crecimiento y desarrollo de colonias en el medio de cultivo adicionado con los aminoácidos ácido aspártico y ácido glutámico. Esto está en línea con el resultado obtenido con los ácidos dicarboxílicos (fuentes de carbono) pues estos compuestos comparten un grupo funcional en común que aparentemente no puede ser empleado por los microorganismos de estudio.

**Tabla 15.** Crecimiento en fuentes de nitrógeno (muestras representativas) a 7 días de incubación.

Microorganismo	Fuentes de nitrógeno							
	Control (-)	Histidina	Arginina	Isoleucina	Serina	Ac. Aspartico	Leucina	Metionina
<b>HAR-17</b>	+++	++++	++++	++++	++++	-	++++	++
<b>HAR-18</b>	+++	++++	++++	++++	++++	-	++++	++
<b>AK-1</b>	++	++++	+++	+++	+++	-	++	++
<b>9(13)</b>	+++	++++	++++	++++	++++	-	+++	++
<b>OAG-B1</b>	-	+	+	-	-	-	-	-
<b>S. yatusi</b>	++	+++	++	++	++	-	++	++
<b>AL-2</b>	++	+++	++	++	++	-	++	++
<b>P5</b>	++	+++	++	++	++	-	+++	++
<b>S. griseus</b>	++	+++	++	++	++	-	+++	++
<b>f(12)</b>	++	+++	++	++	+++	-	+++	++
<b>ae(4)</b>	++	+++	+++	++	++	-	+++	++
<b>OAG-G1</b>	+	++	++	+++	+	-	++	+
<b>e(23)</b>	+	+++	+++	+++	++	-	++	++
<b>Emma-6-12</b>	+	++	+	+++	++	-	+	+

++++: Excelente crecimiento

+++ : Buen crecimiento

++ : Crecimiento regular

+ : Crecimiento pobre

- : Sin crecimiento

**Tabla 16.** Utilización de fuentes de nitrógeno (muestras representativas) a 7 días de incubación.

Microorganismo	Fuentes de nitrógeno							
	Control (-)	Histidina	Arginina	Isoleucina	Serina	Ac. Aspartico	Leucina	Metionina
HAR-17	-	+	+	+	+	-	+	-
HAR-18	-	+	+	+	+	-	+	-
AK-1	-	+	+	+	+	-	-	-
9(13)	-	+	+	+	+	-	-	-
OAG-B1	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>S. yatusi</i>	-	+	-	-	-	-	-	-
AL-2	-	+	-	-	-	-	-	-
P5	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. griseus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-
f(12)	-	+	-	-	+	-	-	-
ae(4)	-	+	+	-	-	-	-	-
OAG-G1	-	+	+	+	-	-	+	-
e(23)	-	+	+	+	+	-	-	-
Emma-6-12	-	+	-	+	+	-	-	-

+: Utilización de la fuente de nitrógeno

-: Sin utilización de la fuente de nitrógeno

**Tabla 17.** Crecimiento fuentes de nitrógeno (muestras representativas) a 14 días de incubación.

Microorganismo	Fuente de nitrógeno							
	Control (-)	Histidina	Arginina	Isoleucina	Serina	Ac. Aspartico	Leucina	Metionina
<b>HAR-17</b>	+++	++++	++++	++++	++++	-	++++	++
<b>HAR-18</b>	+++	++++	++++	++++	++++	-	++++	++
<b>AK-1</b>	++	++++	+++	+++	+++	-	++	++
<b>9(13)</b>	+++	++++	++++	++++	++++	-	+++	++
<b>OAG-B1</b>	-	+	+	-	-	-	-	-
<b><i>S. yatusi</i></b>	++	+++	++	++	++	-	++	++
<b>AL-2</b>	++	+++	++	++	++	-	++	++
<b>P5</b>	++	+++	++	++	++	-	+++	++
<b><i>S. griseus</i></b>	++	+++	++	++	++	-	+++	++
<b>f(12)</b>	++	+++	++	++	+++	-	+++	++
<b>ae(4)</b>	++	+++	+++	++	++	-	+++	++
<b>OAG-G1</b>	+	++	++	+++	+	-	++	+
<b>e(23)</b>	+	+++	+++	+++	++	-	++	++
<b>Emma-6-12</b>	+	++	+	+++	++	-	+	+

++++: Excelente crecimiento

+++ : Buen crecimiento

++ : Crecimiento regular

+ : Crecimiento pobre

- : Sin crecimiento

**Tabla 18.** Utilización de fuentes de nitrógeno (muestras representativas) a 14 días de incubación.

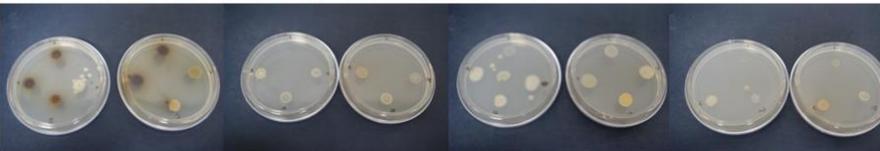
Lectura a 7 días/Tabla de utilización/Fuente de nitrógeno								
Microorganismo	Control (-)	Histidina	Arginina	Isoleucina	Serina	Ac. Aspartico	Leucina	Metionina
HAR-17	-	+	+	+	+	-	+	-
HAR-18	-	+	+	+	+	-	+	-
AK-1	-	+	+	+	+	-	-	-
9(13)	-	+	+	+	+	-	-	-
OAG-B1	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>S. yatusi</i>	-	+	-	-	-	-	-	-
AL-2	-	+	-	-	-	-	-	-
P5	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. griseus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-
f(12)	-	+	-	-	+	-	-	-
ae(4)	-	+	+	-	-	-	-	-
OAG-G1	-	+	+	+	-	-	+	-
e(23)	-	+	+	+	+	-	-	-
Emma-6-12	-	+	-	+	+	-	-	-

+: Utilización de la fuente de nitrógeno

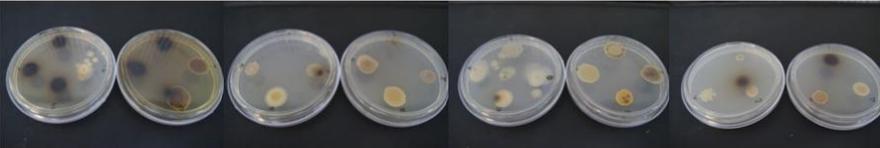
-: Sin utilización de la fuente de nitrógeno

Serina

7 días, anverso de la caja Petri



14 días, anverso de la caja Petri

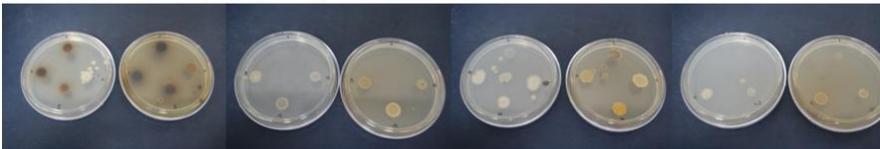


14 días, reverso de la caja Petri



Histidina

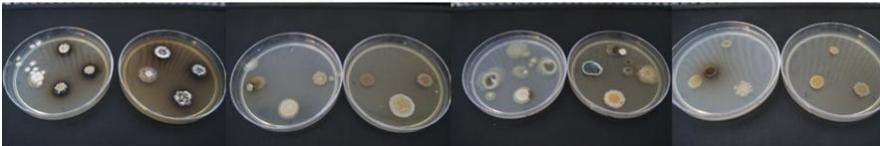
7 días, anverso de la caja Petri



14 días, anverso de la caja Petri

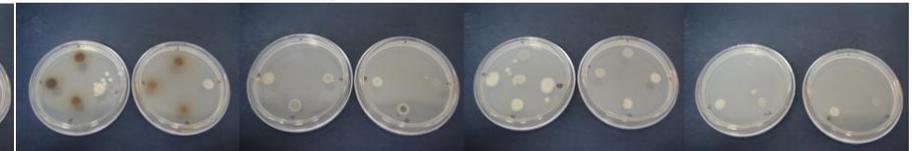


14 días, reverso de la caja Petri

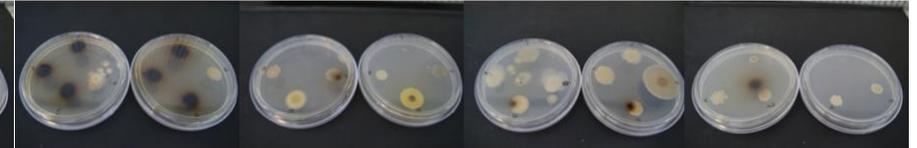


Isoleucina

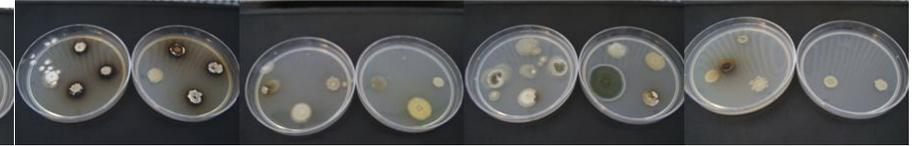
7 días, anverso de la caja Petri



14 días, anverso de la caja Petri

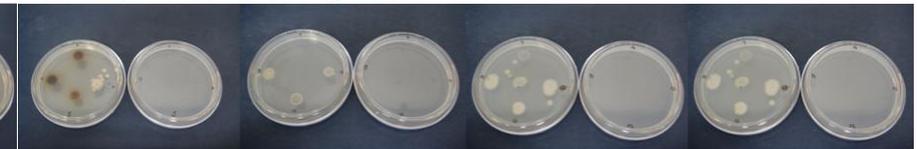


14 días, reverso de la caja Petri



Ác. aspártico

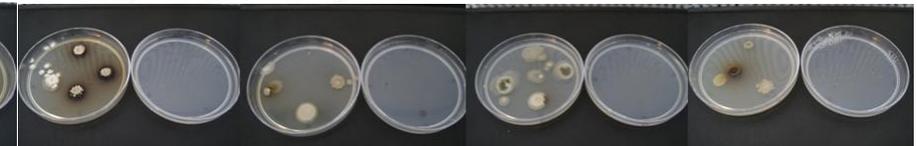
7 días, anverso de la caja Petri



14 días, anverso de la caja Petri



14 días, reverso de la caja Petri



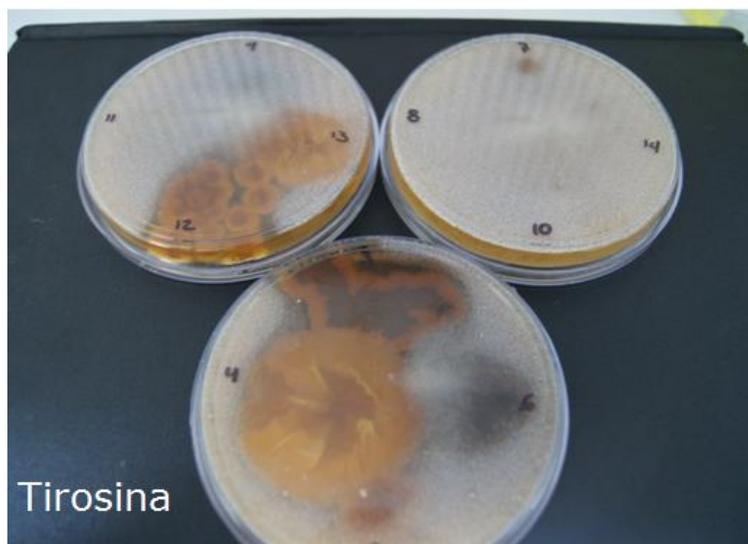
**Figura 15.** Fotografías representativas de la prueba de utilización de fuentes de nitrógeno.

### 6.1.2. Pruebas de degradación

Las pruebas de degradación de los sustratos evaluados se realizaron adicionando al medio GYEA cada uno de los aminoácidos en prueba. Los resultados para este último grupo de pruebas solamente se registraron como degradación positiva (+) o degradación negativa (-) y se ejemplifican en las tablas 19, 20, 21 y 22.

A los catorce días de incubación, siete aislados degradaron uno de los cinco sustratos empleados para este grupo de pruebas y fue solamente en tirosina, dichos aislados fueron; HAR-17, HAR-18, 9(13), OAG-B1, AL-2, f(12) y e(23). Lo anterior se observó por un halo de degradación en el medio de cultivo alrededor de las colonias aisladas como se ejemplifica en la Figura 16.

Los doce microorganismos mostraron buen crecimiento en el medio GYEA por tener fuente de carbono y nitrógeno (anexos) a pesar de la presencia del compuesto de degradación por evaluar pero no todos mostraron la capacidad de degradarlos, ya que estos compuestos tienen una estructura química anillada; no así las Tirosina que tiene una estructura de cadena abierta, lo que permite suponer que estas bacterias metabolizan este último compuesto químico.



**Figura 16.** Degradación de aminoácidos en medio a base GYEA con tirosina a los 14 días.

**Tabla 19.** Crecimiento en medio GYEA a 7 días de incubación.

Microorganismo	Prueba de degradación				
	Adenina	Xantina	Caseína	Tirosina	Hipoxantina
HAR-17	+++	+++	++++	+++	+++
HAR-18	+++	+++	++++	+++	+++
AK-1	+++	+++	++++	+++	+++
9(13)	+++	+++	++++	+++	+++
OAG-B1	-	+	+	+++	+
<i>S. yatusi</i>	++	++	++	++	++
AL-2	-	+	+	+	++
P5	+++	+++	+++	+++	+++
<i>S. griseus</i>	+++	+++	+++	+++	+++
f(12)	+++	+++	+++	+++	+++
ae(4)	++	+++	+++	+++	+++
OAG-G1	-	+	++	+	+
e(23)	+++	++	+++	+++	++
Emma-6-12	-	+	++	++	++

**Tabla 20.** Pruebas de degradación a los 7 días de incubación.

Microorganismo	Prueba de degradación				
	Adenina	Xantina	Caseína	Tirosina	Hipoxantina
HAR-17	-	-	-	-	-
HAR-18	-	-	-	-	-
AK-1	-	-	-	-	-
9(13)	-	-	-	-	-
OAG-B1	-	-	-	-	-
<i>S. yatusi</i>	-	-	-	-	-
AL-2	-	-	-	-	-
P5	-	-	-	-	-
<i>S. griseus</i>	-	-	-	-	-
f(12)	-	-	-	-	-
ae(4)	-	-	-	-	-
OAG-G1	-	-	-	-	-
e(23)	-	-	-	-	-
Emma-6-12	-	-	-	-	-

**Tabla 21.** Crecimiento en medio GYEA a 14 días de incubación.

Microorganismo	Prueba de degradación				
	Adenina	Xantina	Caseína	Tirosina	Hipoxantina
HAR-17	+++	+++	++++	++++	+++
HAR-18	+++	+++	++++	++++	+++
AK-1	+++	+++	++++	+++	+++
9(13)	+++	+++	++++	+++	+++
OAG-B1	-	+	+	+++	+
<i>S. yatusi</i>	++	++	+++	++	++
AL-2	-	++	+++	++++	++
P5	++++	+++	++++	+++	+++
<i>S. griseus</i>	++++	+++	++++	+++	+++
f(12)	++++	+++	++++	++++	+++
ae(4)	++++	+++	++++	++++	++++
OAG-G1	-	+	++	+	+
e(23)	+++	+++	+++	+++	+++
Emma-6-12	-	+	+++	++	++

**Tabla 22.** Pruebas de degradación a 14 días de incubación.

Microorganismo	Prueba de degradación de aminoácidos				
	Adenina	Xantina	Caseína	Tirosina	Hipoxantina
HAR-17	-	-	-	+	-
HAR-18	-	-	-	+	-
AK-1	-	-	-	-	-
OAG-B1	-	-	-	+	-
76-1	-	-	-	-	-
<i>S. yatusi</i>	-	-	-	-	-
AL-2	-	-	-	+	-
P5	-	-	-	-	-
<i>S. griseus</i>	-	-	-	-	-
f(12)	-	-	-	+	-
ae(4)	-	-	-	-	-
OAG-G1	-	-	-	-	-
e(23)	-	-	-	+	-
Emma-6-12	-	-	-	-	-

### 6.1.3. Tolerancia a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl)

A los 7 días de haber sembrado en medio Bennett's modificado, a 0% (control), 10%, 15%, 20% y 30% de NaCl, se tomaron las primeras lecturas. Los resultados obtenidos se indican en la figura 17, tabla 23 y gráfica 1.

En todos los casos se observó buen crecimiento en el medio control (0% NaCl) para todos los microorganismos.

El aislado e(23) a los 7 días presentó crecimiento en la concentración del 10% de NaCl.

Los aislados HAR-17 y HAR-18 mostraron crecimiento a los 7 días en las concentraciones 10% y 15% de NaCl.

El aislado P5 a los 14 días presentó crecimiento en la concentración del 10% de NaCl.

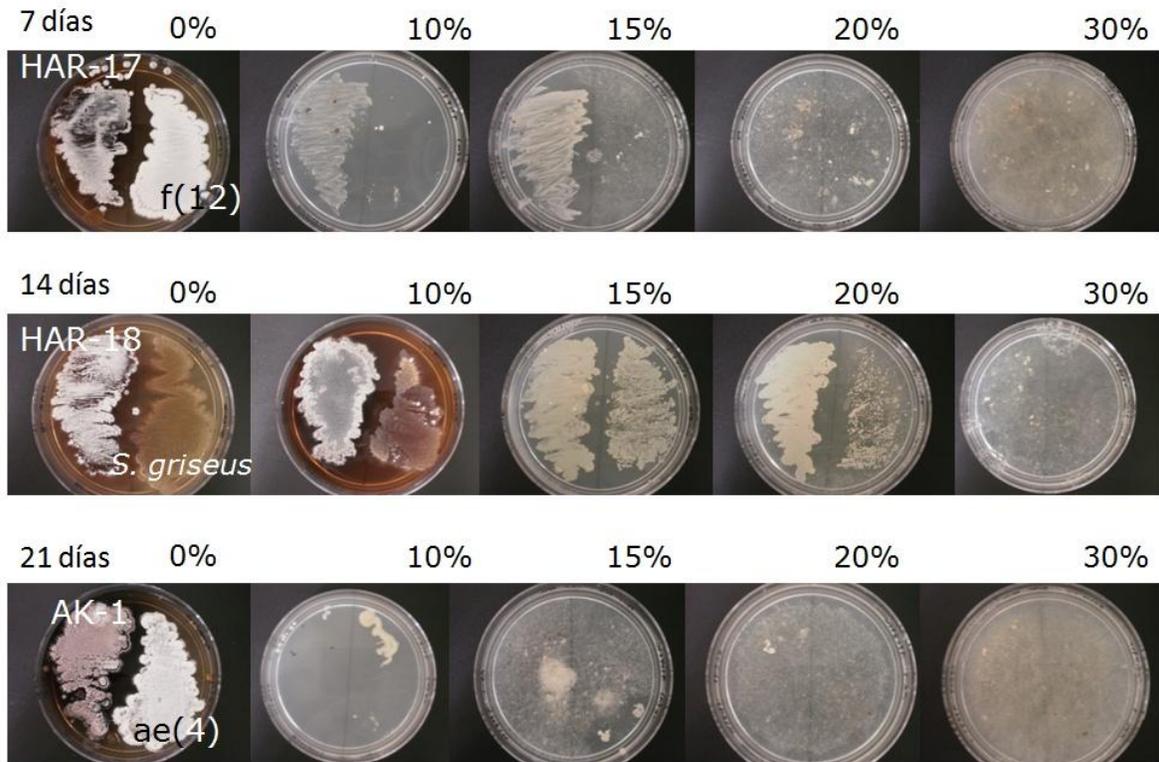
En la cepa *S. griseus* a los 14 días se observó un crecimiento en las concentraciones 10% y 15% de NaCl.

Los aislados e(23), HAR-17 y HAR-18 a los 14 días siguieron con un buen crecimiento en las concentraciones antes mencionadas.

Los aislados e(23), HAR-17, HAR-18, P5 y la cepa de *S. griseus*, a los 21 días siguieron con un buen crecimiento en las concentraciones antes mencionadas.

El efecto en el aumento de la concentración de NaCl en el crecimiento y desarrollo de las cepas es evidente, viéndose notablemente disminuidas en el tamaño y morfología de los aislados.

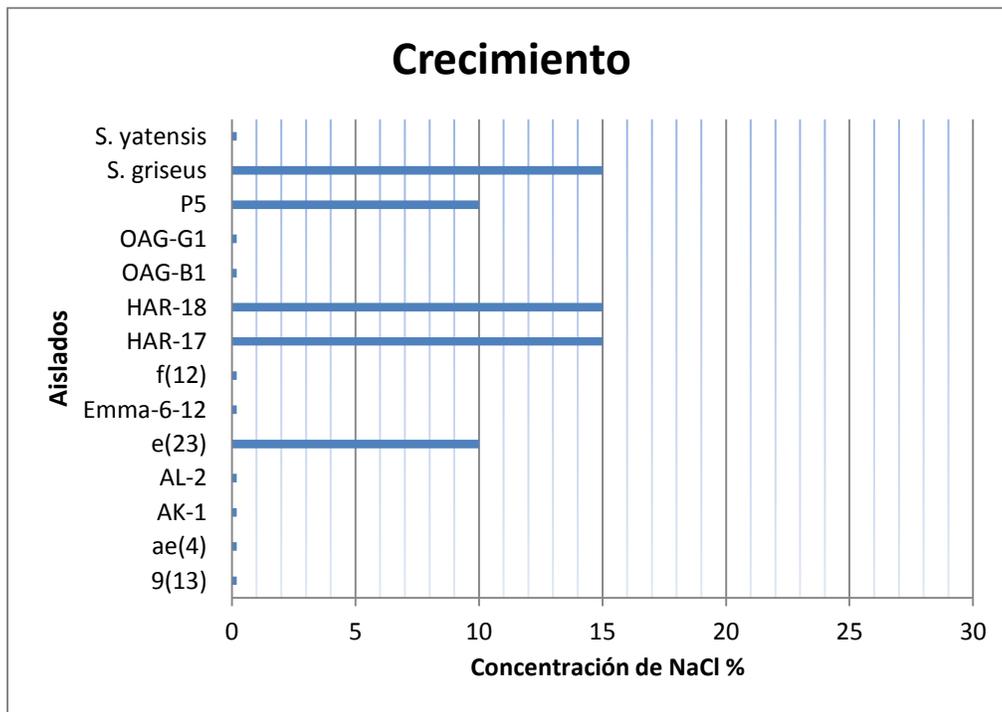
Se observó una buena tolerancia por parte de 5 cepas a la salinidad por lo que seguramente les permite adaptarse bien a condiciones específicas de ambientes marinos.



**Figura 17.** Fotografías representativas de la prueba de tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl.

**Tabla 23.** Crecimiento de los microorganismos a diferentes concentraciones de NaCl a los 21 días.

Aislados	Concentración de NaCl %				
	0	10	15	20	30
9(13)	+	-	-	-	-
ae(4)	+	-	-	-	-
AK-1	+	-	-	-	-
AL-2	+	-	-	-	-
e(23)	+	+	-	-	-
Emma-6-12	+	-	-	-	-
f(12)	+	-	-	-	-
HAR-17	+	+	+	-	-
HAR-18	+	+	+	-	-
OAG-B1	+	-	-	-	-
OAG-G1	+	-	-	-	-
P5	+	+	-	-	-
<i>S. griseus</i>	+	+	+	-	-
<i>S. yatusensis</i>	+	-	-	-	-



**Gráfica 1.** Crecimiento de los microorganismos a diferentes concentraciones de NaCl a los 21 días.

## 6.2. Caracterización quimiotaxonómica

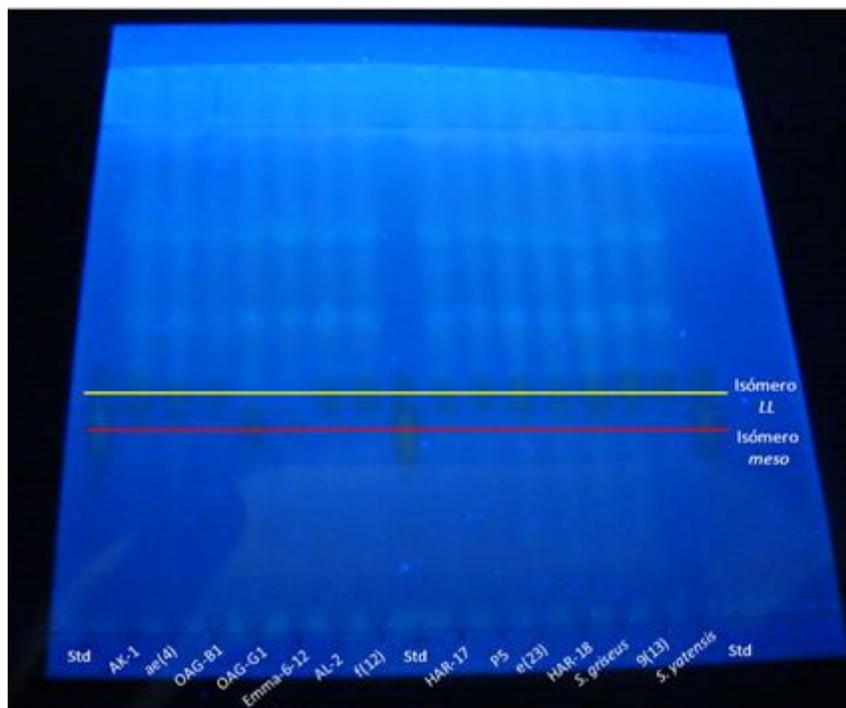
### 6.2.1. DAP

De los 12 aislados y las 2 cepas de referencia se les realizó la prueba de DAP, 12 resultaron tener una pared celular tipo 1, ya que presentaron el isómero *LL-*, que nos indica que son del género *Streptomyces*.

Dos aislados presentaron una pared celular de tipo II, III o IV, caracterizada por la presencia del isómero *meso-*, lo anterior es una referencia para descartar que esos aislados sean del género *Streptomyces* (Tabla 24 y Figura 18).

**Tabla 24.** Resultados del DAP.

Aislados	DAP
9(13)	LL-DAP
ae(4)	LL-DAP
AK-1	LL-DAP
AL-2	LL-DAP
e(23)	LL-DAP
Emma-6-12	<i>meso</i> -DAP
f(12)	LL-DAP
HAR-17	LL-DAP
HAR-18	LL-DAP
OAG-B1	LL-DAP
OAG-G1	<i>meso</i> -DAP
P5	LL-DAP
<i>S. griseus</i>	LL-DAP
<i>S. yatusensis</i>	LL-DAP



**Figura 18.** Placa cromatográfica, donde se corrió el DAP.

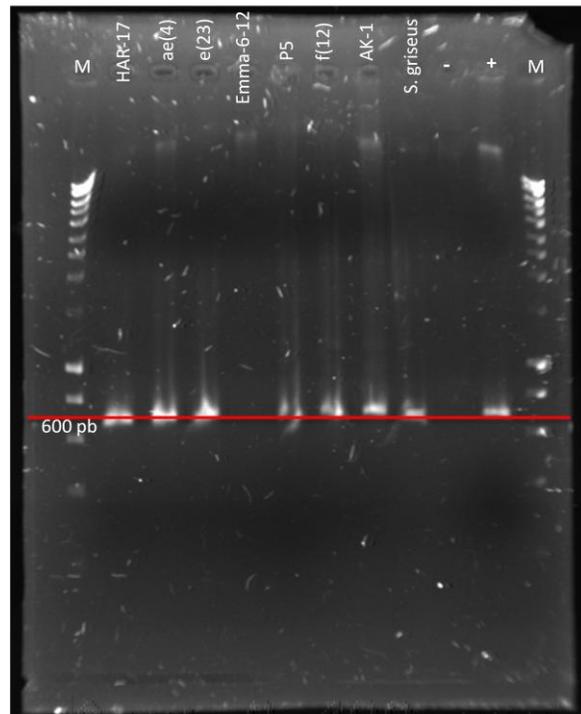
### 6.3. Caracterización genotípica

#### 6.3.1. PCR

Después de haber aislado exitosamente el DNA de los microorganismos en estudio, ya que se comprobó dicho aislamiento con una electroforesis horizontal en agarosa 1%. Se procedió a realizar la PCR Act, donde se comprobó que el 100% de los microorganismos pertenecen a la clase *Actinobacteria*. Con dicha premisa, se procedió a realizar el PCR Sm a todas las bacterias. Donde los resultados, coincidieron con los resultados del DAP, ya que los aislados; 9(13), ae(4), AK-1, AL-2, e(23), f(12), HAR, 17, HAR-18, OAG-B1 y P5, son del género *Streptomyces*, siendo positivos al PCR Sm. En cambio, de los aislados Emma-6-12 y OAG-G1, que fueron negativos al PCR Sm y una pared celular diferente a la que caracteriza a *Streptomyces*, descartamos que ambos aislados sean del género *Streptomyces*. (Tabla 25 y Figura 19)

**Tabla 25.** Resultados de la PCR.

Aislados	PCR Act	PCR Sm
9(13)	+	+
ae(4)	+	+
AK-1	+	+
AL-2	+	+
e(23)	+	+
Emma-6-12	+	-
f(12)	+	+
HAR-17	+	+
HAR-18	+	+
OAG-B1	+	+
OAG-G1	+	-
P5	+	+
<i>S. griseus</i>	+	+
<i>S. yatusi</i>	+	+



**Figura 19.** Resultados de la PCR Sm, de muestras representativas.

### 6.3.2. BLAST y EzTaxon

La secuencia purificada de PCR del gen 16S del ARN de los aislados de trabajo se comparó con aquellas secuencias de la base de datos del NCBI opción BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) y los resultados se indican en la Tabla 26.

**Tabla 26.** Resultados del BLAST para cada una de las secuencias de los aislados.

Microorganismo	Número de bases empleadas en BLAST	Resultado del BLAST	Similaridad (%)	Código GenBank de la secuencia más cercana
9(13)	1211	<i>Streptomyces lavendulae</i>	87	HQ660584.1
ae(4)	1569	<i>Streptomyces sp.</i>	95	EU430553.1
AK-1	1224	<i>Streptomyces carpaticus</i>	90	HQ711933.1
AL-2	1564	<i>Streptomyces sp.</i>	94	EU714252.1
e(23)	1208	<i>Streptomyces sp.</i>	93	EU135661.1
Emma-6-12	1212	<i>Nonomuraea sp.</i>	98	JQ073731.1
f(12)	1206	<i>Streptomyces pluricolorecens</i>	99	FR837631.1
HAR-17	1219	<i>Streptomyces sp.</i>	92	EU080944.1
HAR-18	1618	<i>Streptomyces sp.</i>	92	GQ213972.1
OAG-B1	1572	<i>Streptomyces sp.</i>	94	EU116310.1
OAG-G1	1626	<i>Actinomadura viridis</i>	88	AJ420141.1
P5	1010	<i>Streptomyces drozdowiczii</i>	77	EF654097.1
<i>S. griseus</i>	1615	<i>Streptomyces sp.</i>	91	DQ86243.1
<i>S. yatensis</i>	1252	<i>Streptomyces yatensis</i>	90	AB249962.2

El resultado de esta comparación indica que 12 de los aislados están asociados al género *Streptomyces* concordando con los resultados del DAP y del PCR. Es decir, los aislados 9(13), ae(4), AK-1, AL-2, e(23), f(12), HAR, 17, HAR-18, OAG-B1 y P5; con isómeros LL- en el DAP, característico del género *Streptomyces*, así como positivos en el PCR Sm con primers específicos para *Streptomyces*. De estos 12 aislados identificados como *Streptomyces*, 5 de ellos dieron una comparación en primer plano a nivel de género y especie, aunque en promedio con porcentajes de similaridad bajos: *Streptomyces lavendulae* 87%, *Streptomyces carpaticus* 90%, *Streptomyces pluricolorecens* 99%,

*Streptomyces drozdowiczii* 77% y *Streptomyces yatensis* 90%. Con respecto a las cepas control, *Streptomyces griseus* y *S. yatensis* se hubiera esperado confirmar su identidad al compararlos con la base de datos NCBI pero esto solo ocurrió para *S. yatensis*.

Los aislados Emma-6-12 y OAG-G1 que de acuerdo a los resultados previos sugerían que no pertenecían al género *Streptomyces* por mostrar isómeros *meso*- en su pared celular, así como una reacción negativa (no obtención de ningún producto de PCR) con el par de primers Sm, en estos casos los resultados de la comparación de secuencias indica que Emma-6-12 está relacionada con el género *Nonomuraea* mientras que el aislado OAG-G1 con el género *Actinomadura*. Ésta última dio un resultado con género y especie de *Actinomadura viridis* con un porcentaje de similaridad del 88%.

Los resultados obtenidos para la comparación de la secuencia obtenida pero ahora con la base de datos del software Ez Taxon-e (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net>) se indican en la tabla 27.

El resultado de la comparación de las secuencias del gen 16S RNA en la base de datos Ez Taxon proporcionaron una visión (en algunos de los aislados de estudio) distinta a lo indicado por BLAST. Ez Taxon es una base de datos especializada en taxonomía procarionte y las comparaciones se hacen exclusivamente contra las secuencias de cepas tipo por lo que todos los resultados se dan contra la especie mas cercana. Los porcentajes de similaridad se encuentran por arriba del 90% para todos los aislados de estudio (Tabla 27).

**Tabla 27.** Resultados del Ez Taxon para cada una de las secuencias de los aislados.

Microorganismo	Número de bases empleadas en Ez Taxon	Resultado Ez Taxon	Similaridad (%)	Número de acceso de Ez Taxon
9(13)	1211	<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i> JCM 4364(T)	99.08	AY999770
ae(4)	1569	<i>Streptomyces griseoplanus</i> AS 4.1868(T)	98.97	AY999894
AK-1	1224	<i>Streptomyces carpaticus</i> NBRC 15390(T)	98.41	AB184641
AL-2	1564	<i>Streptomyces hainanensis</i> YIM 47672(T)	99.40	AB184641
e(23)	1208	<i>Streptomyces griseoplanus</i> AS 4.1868(T)	99.21	AY999894
Emma-6-12	1212	<i>Nonomuraea monospora</i> PT708(T)	98.94	FJ347524
f(12)	1206	<i>Streptomyces griseoplanus</i> AS 4.1868(T)	98.42	AY999894
HAR-17	1219	<i>Streptomyces pluricoloescens</i> NBRC 12808(T)	99.38	AB184162
HAR-18	1618	<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i> JCM 4364(T)	99.15	AY999770
OAG-B1	1572	<i>Streptomyces cacaoi subsp. cacaoi</i> NBRC 1248(T)	96.15	AB184115
OAG-G1	1626	<i>Actinomadura viridis</i> IFO 15238(T)	98.12	D85487
P5	1010	<i>Streptomyces drozdowiczii</i> NBRC 101007(T)	94.43	AB249957
<i>S.griseus</i>	1615	<i>Streptomyces violascens</i> IPS 5183(T)	98.78	AY999737
<i>S.yatensis</i>	1252	<i>Streptomyces mordarskii</i> NRRL B-1346(T)	98.10	EF408735

Al compararse los resultados obtenidos entre las dos bases de datos, se encontraron 4 coincidencias: (a) el aislado AK-1 en BLAST y Ez Taxon resultó ser similar a *Streptomyces carpaticus* con valores de similaridad de 90 y 98.41% respectivamente; (b) el aislado P5 resultó ser similar a *Streptomyces drozdowiczii* con 77 y 94.43% (los porcentajes más bajos para ambas tablas); (c) los aislados Emma-6-12 y OAG-G1, pero que como se indicó previamente no corresponden al género *Streptomyces*. Para este último caso, ambos resultaron del mismo género en ambas bases de datos, el primero para ambos es *Nonomuraea* pero para Ez Taxon *Nonomuraea monospora* con 98.94% y para el aislado OAG-G1 en ambos resultados fue *Actinomadura viridis* pero con valores del 88 y 98.12%, respectivamente.

Una comparación de los resultados obtenidos de la base de datos de Ez Taxon y los clados reportados en el trabajo de Labeda y colegas (2012) se muestra en la tabla 28.

**Tabla 28.** Resultados del Ez Taxon para cada una de las secuencias de los aislados, relacionados con los clados del gen ARN 16S de Labeda *et al.* (2012).

Microorganismos	Resultados Ez Taxon	Clado (Labeda, 2012)	Microorganismos	Resultados Ez Taxon	Clado (Labeda, 2012)
<b>9(13)</b>	<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i>	N/A	<b>HAR-17</b>	<i>Streptomyces pluricologrescens</i>	N/A
	<i>Streptomyces griseoplanus</i>	54		<i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i>	42
	<i>Streptomyces griseorubiginosus</i>	7		<i>Streptomyces setonii</i>	N/A
	<i>Streptomyces halstedii</i>	36		<i>Streptomyces griseoplanus</i>	54
	<i>Streptomyces microflavus</i>	N/A		<i>Streptomyces sindenensis</i>	N/A
<b>ae(4)</b>	<i>Streptomyces griseoplanus</i>	54	<b>HAR-18</b>	<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i>	N/A
	<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i>	N/A		<i>Streptomyces pluricologrescens</i>	N/A
	<i>Streptomyces cinereorectus</i>	61		<i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i>	42
	<i>Streptomyces setonii</i>	N/A		<i>Streptomyces parvus</i>	N/A
	<i>Streptomyces pluricologrescens</i>	N/A		<i>Streptomyces setonii</i>	N/A
<b>AK-1</b>	<i>Streptomyces carpaticus</i>	128	<b>OAG-B1</b>	<i>Streptomyces cacaoui subsp. cacaoui</i>	21
	<i>Streptomyces cheonanensis</i>	N/A		<i>Streptomyces hainanensis</i>	129
	<i>Streptomyces hyderabadensis</i>	N/A		<i>Streptomyces sodiiphilus</i>	N/A
	<i>Streptomyces lacticiproducens</i>	64		<i>Streptomyces ragoonensis</i>	126
	<i>Streptomyces xiamenensis</i>	128		<i>Streptomyces albus subsp. albus.</i>	120
<b>AL-2</b>	<i>Streptomyces hainanensis</i>	129	<b>P5</b>	<i>Streptomyces drozdowiczii</i>	N/A
	<i>Streptomyces globisporus</i>	129		<i>Streptomyces brevispora</i>	N/A
	<i>Streptomyces pluricologrescens</i>	129		<i>Streptomyces beijiangensi</i>	N/A
	<i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i>	129		<i>Streptomyces laculatispora</i>	N/A
	<i>Streptomyces pluricologrescens</i>	77		<i>Streptomyces setonii</i>	N/A
<b>e(23)</b>	<i>Streptomyces griseoplanus</i>	54	<b>S.griseus</b>	<i>Streptomyces violascens</i>	29
	<i>Streptomyces setonii</i>	N/A		<i>Streptomyces albidoflavus</i>	112
	<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i>	N/A		<i>Streptomyces somaliensis</i>	85
	<i>Streptomyces cinereorectus</i>	61		<i>Streptomyces hydrogenans</i>	N/A
	<i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i>	42		<i>Streptomyces daghestanicus</i>	N/A
<b>f(12)</b>	<i>Streptomyces griseoplanus</i>	54	<b>S.yatensis</b>	<i>Streptomyces mordarskii</i>	80
	<i>Streptomyces globisporus</i>	112		<i>Streptomyces geldanamycininus</i>	N/A
	<i>Streptomyces pluricologrescens</i>	N/A		<i>Streptomyces yatensis</i>	N/A
	<i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i>	42		<i>Streptomyces actimycoticus</i>	N/A
	<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i>	N/A		<i>Streptomyces melanosporofaciens</i>	80

#### 6.4. Evaluación del medio de arroz

Para la evaluación del medio a base de arroz, se plantearon seis diferentes medios, con diferentes concentraciones del cereal y con o sin sales traza. Estas seis variantes se emplearon para establecer el diseño de cuál sería el mejor medio prototipo con una composición muy similar al ISP-3 y tomando como premisa el requerir un medio de color blanco para contrastar con los colores que genera el micelio aéreo y las diferentes tonalidades de los pigmentos que sintetizan los estreptomicetos.

Un estudio de mercado (<https://www.superama.com.mx> // <http://www1.soriana.com/site/default.aspx?p>) permitió verificar los precios y las presentaciones que se encuentran tanto de la avena como del arroz. En este sentido, el precio promedio del kilo de arroz resultó ser de \$15.63 MNX (promediando cinco marcas diferentes) y el precio promedio de 400g de avena se encuentra en \$12.90 MNX (promediando tres marcas diferentes). Al menos con respecto al costo, resulta una mejor opción utilizar el arroz debido a que (a) es más económico y (b) se encuentran más alternativas en el mercado tanto de marcas como de presentaciones.

La preparación de estos medios a base de cereales es más complicada en comparación a los medios deshidratados, pues es necesario hervir un litro de agua con la cantidad de cereal predeterminada (para agar avena 20g) durante 30 a 40 minutos, posteriormente se cuela y se comprime el cereal contra una coladera por 5 minutos, aforando a un litro, agregar solución de sales traza, ajustar pH y esterilizando. El arroz presentó mayores problemas al momento de hervirlo con el agua pues se “infla” más que la avena, desbordándose del vaso en pocos minutos lo que hace que la preparación requiera mas cuidado. De las diferentes

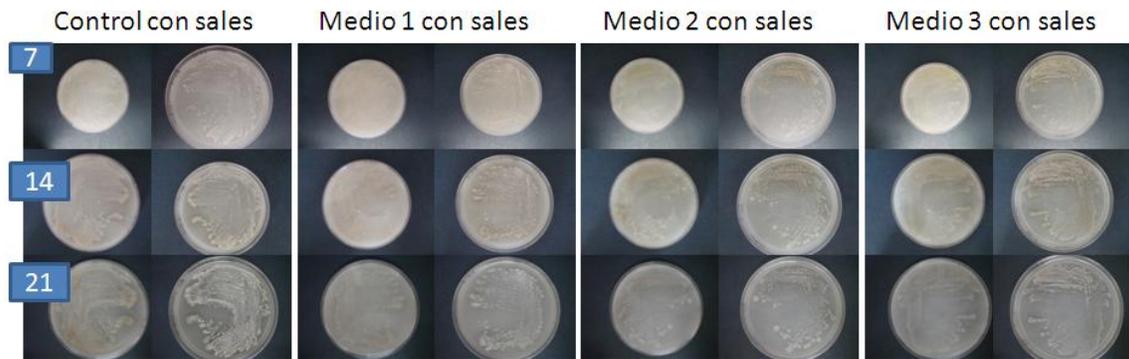
evaluaciones realizadas, el medio 3 AZ con 60g de arroz en un litro de agua, duró 60 minutos la etapa de ebullición por los problemas antes mencionados. La preparación del medio 1 AZ fue muy similar a la preparación del medio de avena, ya que son muy semejante a los porcentajes con respecto al agar avena.

La producción de pigmento, un parámetro importante para la caracterización estreptomicetos como se ha mencionado, dió diferentes resultados de acuerdo a cada aislado sin ningún patrón específico. Mientras en algunos de los medios de estudio el pigmento apareció en menor tiempo (por ejemplo debajo de los 7 o 14 días de crecimiento), en otros medios tardó más, mientras que en otros nunca se llegó a observar. También es de mencionarse que la cantidad de pigmento producido fue en mayor o menor proporción. Adicionalmente, en algunos medios la producción del micelio aéreo era más temprana y en mayores proporciones que en otros de los medios evaluados.

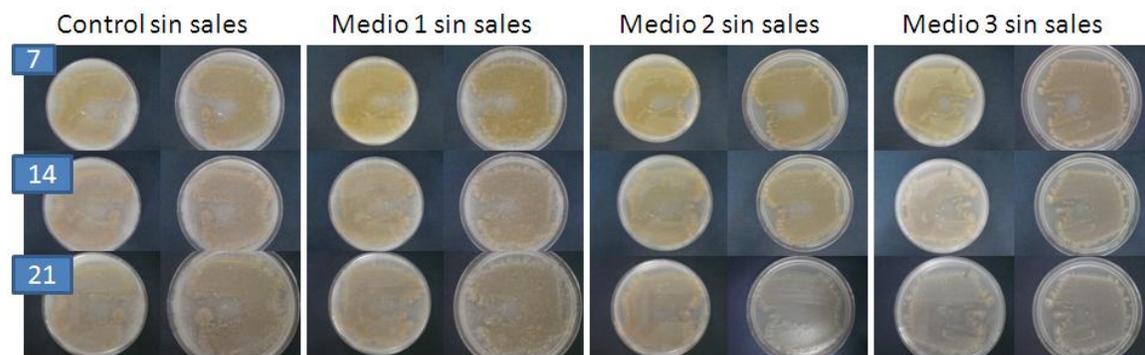
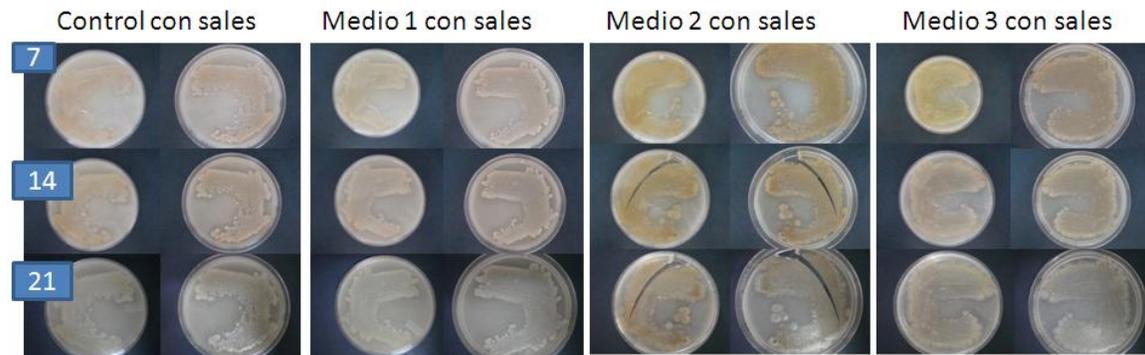
Con respecto a la morfología colonial y el crecimiento, éste fue muy variado dentro de los diferentes medios de cultivo para el mismo aislado, es decir, cambios en la forma y color de la colonia y micelio de un medio con sales traza a otro sin sales traza. Tampoco existió algún patrón específico en medios que tuvieran o carecieran de sales traza como en la receta del agar avena. En este sentido, aparentemente la adición de sales traza para el agar arroz no parece tener un efecto crítico en el crecimiento y morfología colonial, lo que lo colocaría como una ventaja ante el ISP-3.

Se registraron los resultados a 7, 14 y 21 días de incubación con imágenes representativas en las Figuras 20 y 21.

Aislado **AK-1** a 7, 14 y 21 días de crecimiento, respectivamente.



Aislado **AL-2** a 7, 14 y 21 días de crecimiento, respectivamente.

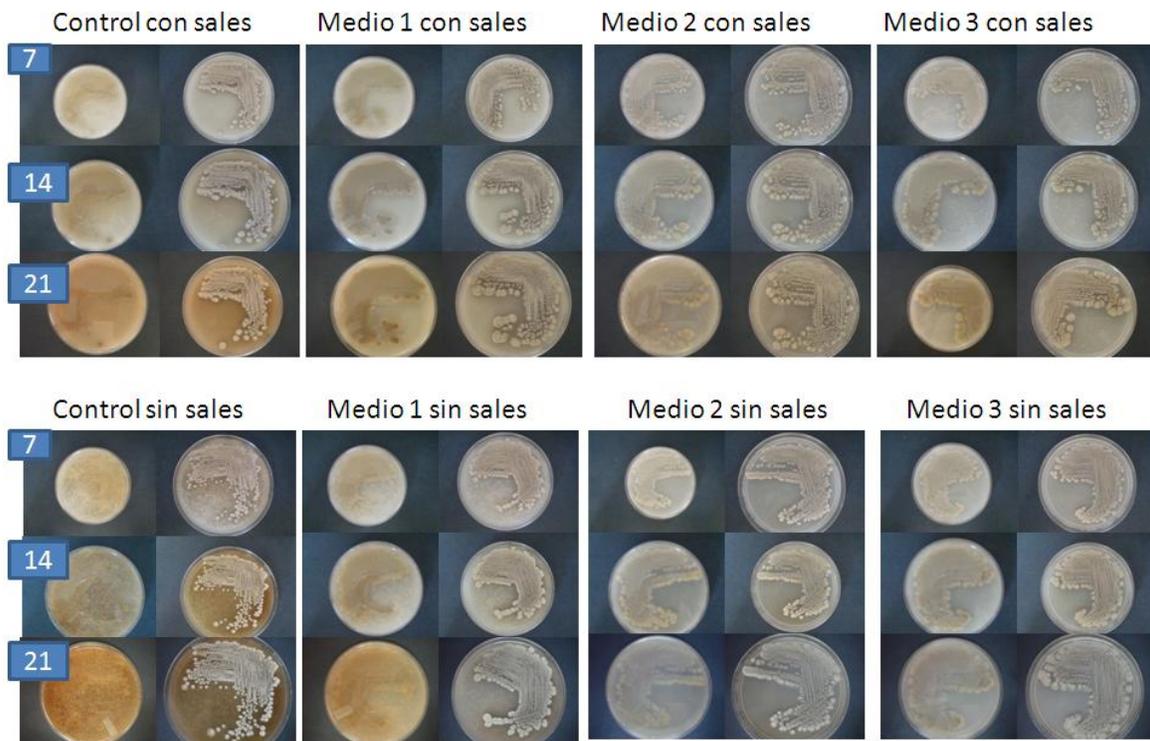


**Figura 20.** Medio de arroz, aislados AK-1 y AL-2; las nomenclaturas de los medio evaluados se especifican en las Figuras 13 y 14 de la sección Metodología Experimental.

Aislado *S. yatenis* a 7, 14 y 21 días de crecimiento, respectivamente.



Aislado P5 a 7, 14 y 21 días de crecimiento, respectivamente.



**Figura 21.** Fotos representativas de la evaluación del medio de arroz, con los microorganismos *S. yatenis* y P5.

A los 21 días de evaluación, cada aislado mostró un comportamiento diferente como se describe a continuación.

**Aislado e(23).** Se observó una generación abundante de pigmentos en el medio de avena así como en el medio de arroz pero en menor proporción. Si bien la producción de pigmento en los medios con arroz fue menor que en los de avena, la formación del micelio aéreo se presentó primero en el medio 3 AZc.

**Aislado f(12).** Mayor producción de pigmento en agar avena, así como un crecimiento más abundante, comparado con el agar arroz. Se observa una diferencia en morfología colonial muy marcada entre ambos medios.

**Aislado 9(13).** En general se presentó un crecimiento más abundante, así como más producción de pigmento en agar avena, en comparación del agar arroz.

**Aislado AK-1.** Se formó el micelio aéreo primero en el agar arroz que en agar avena, presentándose la aparición del micelio en el agar arroz a los 7 días y en el agar avena a los 14 días. En este caso, la presencia de pigmento fue mayor en el agar arroz que en el agar avena.

**Aislado ae(4).** Se generó un pigmento muy notorio en el medio 2 y 3 del agar arroz sin sales traza y en el medio 1 de arroz no hubo formación de pigmento. Este aislado mostró muy poco crecimiento en agar avena además de observarse una diferencia significativa en la morfología colonial entre ambos medios.

**Aislado HAR-17.** Hubo mayor generación de pigmento en el agar arroz, donde se presentó un pigmento más oscuro en el medio 3 en comparación de los medios 1 y 2 del agar arroz tanto con y sin sales

traza. Hubo además crecimiento lento y sin producción de pigmento en el agar avena.

**Aislado HAR-18.** En todos los medios se generó pigmento en gran cantidad, sin verse diferencias entre los medios evaluados donde se sembró al microorganismo. Hubo una diferencia significativa en la morfología colonial entre el medio de avena y el de arroz.

**Aislado P5.** Se presentó la producción de pigmento hasta el día 21 de incubación y sólo se presentó en los medios adicionados con sales traza.

***Streptomyces griseus.*** Diferencia morfológica de las colonias entre ambos medios de arroz y avena. Una producción de pigmento más notaria en el medio de avena, en comparación a los medios de arroz.

***Streptomyces yatensis.*** En el agar de avena y en el medio 1 del agar de arroz, se observaron colonias grises con bordes blancos. En el medio 2 y 3 del agar de arroz, colonias negras con bordes blancos y una producción de pigmento muy abundante.

**Aislado AL-2.** Generó un pigmento más oscuro en los medios de arroz, en comparación de los medios de avena.

**Aislado OAG-B1.** En el medio 3 de arroz, de los 12 aislados estudiados, solo OAG-B1 tuvo problemas de crecimiento en los medios de prueba donde, en los medios de avena y los medios 1 y 2 de arroz; dicho crecimiento muy lento. A pesar del escaso crecimiento, éste fue bueno y con una producción abundante de pigmento en el medio AZ medio 3.

De los 12 microorganismos en prueba, 7 presentaron un mejor crecimiento, tanto desarrollo temprano de micelio como mayor producción de micelio en el medio de arroz mientras los 5 microorganismos restantes crecen mejor en el medio de avena. Los

resultados fueron muy variados como se indicó previamente ofreciendo además diferentes morfologías coloniales, producción de micelio o pigmentos, entre los medios de agar avena y agar arroz. En lugar de una sustitución del agar avena, tal vez los medios podrían emplearse como complementarios para la caracterización de *Streptomyces*.

Se recomienda utilizar el medio 1 AZc, ya que es el que tiene 25mg de arroz, que sería una concentración aproximada a la del medio de avena y el manejo en laboratorio es mejor al calentar poca cantidad de arroz en agua. Si bien, no parecen existir diferencias significativas entre los medios que contenían sales traza de los que no, se recomienda utilizar las sales traza, ya que los microorganismos pueden necesitar estos elementos metálicos para su metabolismo enzimático.

Debido a la capacidad innata de los estreptomicetos para la generación de metabolitos secundarios y toda la información recopilada en este trabajo, se hizo finalmente una búsqueda para establecer una comparación global, tanto fenotípica como genotípica de los aislados de *Streptomyces* que se trabajaron en esta tesis y a cuáles corresponderían de los clados de Labeda y colaboradores (2012) así como, tal vez, la producción de algún metabolito farmacológicamente activo.

1. El aislado 9(13) tuvo similitud con tres especies del género *Streptomyces* que se encuentran referenciadas por Labeda y colegas (2012) donde las 3 están descritas como colonias grises y con un micelio aéreo liso. El aislado 9(13) genera colonias cafés claras al igual que su pigmento y su micelio aéreo es rugoso. Con lo anterior y con el porcentaje de similitud al microorganismo identificado como más cercano, con el cual no se considera que sean secuencias idénticas, podríamos decir que este es un microorganismo diferente al identificado por la base de datos Ez Taxon.

De los tres microorganismos referenciados por Labeda *et al.* (2012) son *Streptomyces* bien caracterizados y que producen metabolitos secundarios farmacológicamente activos, como es el caso de *Streptomyces halstedii* que sintetiza la carbomicina, que es un antibiótico de la familia de los macrólidos (Korolkova *et al.*, 1983); *Streptomyces microflavus* produce un antiviral llamado Fativiracina A1 (Uyeda *et al.*, 1998; Yokomizo *et al.*, 1998).

2. El aislado ae(4) tuvo similitud con dos especies del género *Streptomyces* que se encuentran referenciadas por Labeda *et al.* (2012), donde los dos están descritas como colonias grises y con un micelio aéreo liso, mientras que el aislado ae(4) tiene colonias cafés claras, su pigmento café oscuro y su micelio aéreo es rugoso. Con lo anterior y con el porcentaje de similitud al microorganismo identificado como más cercano, con el cual no se considera que sean secuencias idénticas, podríamos decir que este es un microorganismo diferente al identificado por la base de datos Ez Taxon.

De los dos microorganismos referenciados por Labeda *et al.* (2012), que son *Streptomyces* bien caracterizados y que producen metabolitos secundarios farmacológicamente activos, en este clado se encuentra *Streptomyces griseoplanus* que sintetiza una molécula llamada "Anticapsina" que es un inhibidor de la síntesis del ácido hialurónico de la cápsula de *Streptococcus pyogenes* (Boeck *et al.*, 1971; Neuss *et al.*, 1970).

3. El aislado AK-1 tuvo similitud con tres especies del género *Streptomyces* que se encuentran referenciadas por Labeda *et al.* (2012), donde dos de los tres microorganismo que se encuentran en el clado 128, están descritos como colonias grises y con un micelio aéreo liso, el aislado AK-1 corresponde con dicha descripción; el tercer

microorganismo está descrito como colonias amarillas-grisáceas y micelio plano. Con lo anterior y con el porcentaje de similitud al microorganismo identificado como más cercano, con el cual no se considera que sean secuencias idénticas, podríamos decir que este es un microorganismo diferente al identificado por la base de datos Ez Taxon, pero podríamos pensar que puede pertenecer al clado 128.

De los dos microorganismos referenciados por Labeda *et al.* (2012), que son *Streptomyces* bien caracterizados y que producen metabolitos secundarios farmacológicamente activos, como es el caso de *Streptomyces carpaticus* que sintetiza una proteasa (Haritha *et al.*, 2012) y como el caso de *Streptomyces lacticiproducens* que es un productor de ácido láctico (Zhu *et al.*, 2011).

4. El aislado AL-2 tuvo similitud con las cinco especies del género *Streptomyces* que se encuentran referenciadas por Labeda *et al.* (2012), donde cuatro de los cinco microorganismos se encuentran en el clado 129, donde cuatro de éstos están descritos como colonias amarillas y con un micelio aéreo liso, el aislado AL-2 corresponde con dicha descripción. El quinto microorganismo está descrito como colonias grises y micelio rugoso. Con lo anterior y con el porcentaje de similitud al microorganismo identificado como más cercano, con el cual no se considera que sean secuencias idénticas, podríamos decir que este es un microorganismo diferente al identificado por la base de datos Ez Taxon, pero podríamos pensar que puede ser parte del clado 129.

De los cinco microorganismos referenciados por Labeda *et al.* (2012), que son *Streptomyces* bien caracterizados y que producen metabolitos secundarios activos, como es el caso de *Streptomyces rapamycinicus* que sintetiza la rapamicina que es un antibiótico de tipo polieno y tiene variados efectos terapéuticos, ya que funciona como agente antifúngico,

antineoplásico e inmunosupresor (Kumar & Goodfellow, 2008; Vezina, 1975).

5. El aislado e(23) tuvo similitud con tres especies del género *Streptomyces* que se encuentran referenciadas por Labeda *et al.* (2012), donde los tres están descritos como colonias grises y con un micelio aéreo liso, el aislado e(23) corresponde con dicha descripción. Por el porcentaje de similitud al microorganismo identificado como más cercano, con el cual no se considera que sean secuencias idénticas, podríamos decir que este es un microorganismo diferente al identificado por dicha base de datos.

De los tres microorganismos referenciados por Labeda (2012), que son *Streptomyces* bien caracterizados y que producen metabolitos secundarios con actividad farmacológica, nuevamente el caso de *Streptomyces griseoplanus*.

6. El aislado f(12) tuvo similitud con tres especies del género *Streptomyces* que se encuentran referenciadas por Labeda *et al.* (2012), donde los tres están descritos como colonias rojizas y con un micelio aéreo liso, el aislado f(12) es de colonias blancas con micelio aéreo rugoso. Por lo anterior y por el porcentaje de similitud al microorganismo identificado como más cercano, con el cual no se considera que sean secuencias idénticas, podríamos decir que este es un microorganismo diferente al identificado por la base de datos Ez Taxon.

De los tres microorganismos referenciados por Labeda *et al.* (2012), que son *Streptomyces* bien caracterizados y que producen metabolitos secundarios farmacológicamente activos, nuevamente el caso de *Streptomyces griseoplanus* y como el caso de *Streptomyces globisporus*

que sintetiza un agente antitumoral identificado como C-1027-AG (Otani *et al.*, 1991).

7. El aislado HAR-17 tuvo similitud con dos especies del género *Streptomyces* que se encuentran referenciadas por Labeda *et al.* (2012), donde los dos están descritos como colonias grises y rojizas, con un micelio aéreo liso, el aislado HAR-17 tiene colonias cafés claras, su pigmento café oscuro y su micelio aéreo es rugoso. Por lo anterior y por el porcentaje de similitud al microorganismo identificado como más cercano, con el cual no se considera que sean secuencias idénticas, podríamos decir que este es un microorganismo diferente al identificado por dicha base de datos.

De los dos microorganismos referenciados por Labeda *et al.* (2012), que son *Streptomyces* bien caracterizados y que producen metabolitos secundarios farmacológicamente activos, nuevamente el caso de *Streptomyces griseoplanus* y el caso de *Streptomyces sindenensis* que sintetiza una molécula llamada Actinomicina-D un antibiótico de la familia de los aminoglucósidos (Praveen *et al.*, 2008).

8. El aislado HAR-18 tuvo similitud con una especie del género *Streptomyces* que se encuentran referenciadas por Labeda *et al.* (2012), donde dicho microorganismos está descrito como colonias rojizas, con un micelio aéreo liso, mientras que el aislado HAR-18 tiene colonias cafés, su pigmento café oscuro y su micelio aéreo es rugoso. Por lo antes mencionado y por el porcentaje de similitud al microorganismo identificado como más cercano, con el cual no se considera que sean secuencias idénticas, podríamos decir que este es un microorganismo diferente al identificado por la base de datos Ez Taxon.

Los microorganismos referenciados por Labeda *et al.* (2012), que son *Streptomyces* bien caracterizados y que producen metabolitos secundarios con actividad farmacológica.

9. El aislado P5 no tuvo similitud con especies del género *Streptomyces* que se encuentran referenciadas por Labeda *et al.* (2012).

Por el porcentaje de similitud al microorganismo identificado como más cercano, con el cual no se considera que sean secuencias idénticas, podríamos decir que este es un microorganismo diferente al identificado por la base de datos Ez Taxon.

10. El aislado OAG-B1 tuvo similitud con cuatro especies del género *Streptomyces* que se encuentran referenciadas por Labeda *et al.* (2012), donde las cuatro están descritas como colonias blancas, con un micelio aéreo liso, el aislado OAG-B1 tiene colonias amarillas, pigmento café claro y su micelio aéreo es liso. Por lo antes mencionado y por el porcentaje de similitud al microorganismo identificado como más cercano, con el cual no se considera que sean secuencias idénticas, podríamos decir que este es un microorganismo diferente al identificado por dicha base de datos.

Si bien no se identificó con género y especie a los aislados, la similitud de las secuencias son buenas, por lo que se podría sugerir que si los *Streptomyces* identificados en los clados de Labeda *et al.* (2012) producen moléculas activas, los aislados de *Streptomyces* también puede producir metabolitos secundarios farmacológicamente activos, por lo que se sugiere realizar pruebas específicas para identificar las moléculas activas.

Si bien, los aislados Emma-6-12 y OAG-G1, no se incluyeron como tal en esta parte final de los resultados por haberse encontrado que no pertenecen al género *Streptomyces*, también se sembraron en los medios en evaluación y también arrojaron resultados interesantes. El aislado OAG-G1 (género *Actinomadura*) no creció ni en agar avena, ni en agar arroz. El aislado Emma-6-12 (género *Nonomuraea*) creció bien en los medios a base de arroz, sobre todo en el medio 1 Azc con generación de pigmento a los 21 días de crecimiento (figura 22). Lo anterior podría sugerir que el medio de arroz podría funcionar para caracterizar al género *Nonomuraea*, evaluando más especies de dicho género para observar si esto se repite.

Aislado Emma-6-12 a 7, 14 y 21 días de crecimiento, respectivamente.



**Figura 22.** Fotos de la evaluación del medio de arroz con el aislado Emma-6-12.

## 7. CONCLUSIONES

Las especies del género *Streptomyces* constituyen la gran mayoría de los taxones dentro de la familia *Streptomycetaceae*, son un componente predominante de la población microbiana en los suelos y medios acuáticos de todo el mundo y han sido objeto de aislamiento e identificación en los últimos años, ya que son una fuente de metabolitos secundarios activos farmacológicamente e importantes para el comercio y la medicina. Por lo que la caracterización de estos microorganismos es primordial, el estudio de condiciones experimentales, medios de cultivos óptimos, la determinación de características morfológicas y propiedades de pigmentación, así como los perfiles de utilización de carbono son parte de esta labor.

La caracterización quimiotaxonómica es importante pues proporciona resultados confiables sin necesidad de emplear herramientas de biología celular y las 12 cepas de estudio se caracterizaron por tener una pared celular tipo 1, que nos indica que son del género *Streptomyces* y estos resultados coincidieron con los de la caracterización genotípica. Dos aislados que parecían *Streptomyces* resultaron ser de otros géneros, *Actinomadura* y *Nonomuraea* (pared celular con el isómero tipo *meso*-).

La caracterización fenotípica permitió establecer los perfiles de utilización de moléculas orgánicas, que son importantes para el diseño de medios de cultivo o identificación de los microorganismos, así como para conocer el comportamiento de dichos microorganismos en la naturaleza. Es por eso que se realizaron las pruebas de degradación de aminoácidos, la curva de

tolerancia a NaCl y las pruebas de utilización de fuentes de carbono y nitrógeno.

La caracterización genotípica, tanto las herramientas de la biología molecular como el empleo de bases de datos electrónicas, son importantes para conocer los microorganismos con los que se está trabajando. Ninguno de los 12 aislados resultó con una similaridad del 100% contra las secuencias depositadas en las bases de datos NCBI o EZ-Taxon. Lo anterior sugiere que los microorganismos de estudio posiblemente se traten de nuevas especies que podrían ser descritas y está en línea con la sugerencia de que México es un país altamente biodiverso inclusive en cuanto a su diversidad microbiológica.

Se evaluó un nuevo medio de cultivo a base de arroz como sustrato y que representa una nueva alternativa para caracterizar miembros del género *Streptomyces*. Con esta nueva alternativa se lograron observar diferencias notables en las características de crecimiento, morfología colonial, producción del micelio aéreo y de pigmento. Lo que representa un medio para la caracterización de *Streptomyces*.

Se sugiere utilizar el medio 1 AZ (25mg de arroz) que es una proporción aproximada a la del medio ISP-3 con sales traza. Sí bien el medio de agar arroz no viene a sustituir al agar avena, de acuerdo a este estudio si podría complementar la gama de medios para caracterizar a *Streptomyces* por los diferentes resultados obtenidos en la comparación y por sus características favorables de composición y color. El agar arroz se convierte en una clave más para la caracterización fenotípica de microorganismos de este importante género.

## 8. PERSPECTIVAS

- Realizar un árbol filogenético de secuencias del gen ARN 16S con todas las secuencias del género *Streptomyces* y los aislados de este estudio para establecer exactamente las relaciones que existen entre las especies y los aislados así como para determinar sus distancias evolutivas.
- Evaluar la actividad farmacológica (antibacteriana o antifúngica) de los microorganismos de este estudio, al enfrentarlos contra bacterias Gram positivas, Gram negativas, levaduras y hongos patógenos.
- Realizar un estudio más extenso que ahora incluya cepas tipo para continuar con la evaluación y optimización del medio propuesto con base en arroz así como comparaciones contra el agar avena.
- Considerar el empleo del agar arroz para otros géneros de *Actinobacteria*.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Anderson A. S. & Wellington E. M. 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 51: 797-814.
2. Baltz R. S. 2007. Antimicrobials from actinomycetes: Back to the future. Microbe. 2: 125-131.
3. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2012.
4. Boeck L. D., Goodfellow M., Christy K. L. & Shah R. 1971. Production of Anticapsin by *Streptomyces griseoplanus*. Applied Microbiology. Vol. 21(6): 1075-1079.
5. Bolivar Z. F. 2004. Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna. Editorial Colegio Nacional. Pp 718.
6. Challis L. G & Hoopwood A. D. 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100: 14555-14561.
7. Chun J., Lee J-H., Jung Y., Kim M., Kim S., Kwon Kim B. and Lim Y-W. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57: 2259-2261.
8. Contreras L. 2011. Visión actual del metabolismo secundario en *Streptomyces*. Trabajo monográfico de actualización, QFB, Facultad de Química, UNAM. 1-29.
9. Demain A. L. 2000. Small bugs, big business: The economic power of the microbe. Biotechnology Advances, 18: 499-514.

10. Dendy A. V. 2004. Cereales y productos derivados. Química y tecnología. PhD Consultant Grains After Harvest Oxfordshire, United Kingdom.
11. Dworkin M., Schieffer H., Stackenbrandt E., Springer A. 2007. The Prokaryotes: An evolving electronic resource for the microbiological Community. 3er edition. Vol. 3: Archaea, Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes.
12. Euzéby P. 2007. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. Accessed. <http://www.bacterio.cict.fr/>
13. Goodfellow M., Sandoval Trujillo H., Sánchez-Saucedo N. L. 2005. Aspectos taxonómicos, bacteriológicos, citoquímicos y de diagnóstico microbiológico de actinomicetos aerobios. En: *Actinomicetoma*. Universidad Autónoma Metropolitana – Xochimilco, México.
14. Haritha R., Kumar K., Swathi A., Jagan Mohan Y. S. & T. Ramana. 2012. Characterization of Marine *Streptomyces carpaticus* and Optimization of Conditions for Production of Extracellular Protease. Microbiology Journal. Vol. 2; 23-35.
15. Hopwood D. A. 2007. *Streptomyces* in nature and medicine: The antibiotic makers. Oxford University Press, New York.
16. Hunter-Cervera J. C. 1998. The value of microbial diversity. Current Opinion in Microbiology, 1:278-285.
17. Kieser T. 2000. Practical *Streptomyces* Genetics. The John Innes Foundation Norwich. England. Pp 19-30.
18. Koneman E. W., Allen S. D., Janda W. M., Schreckenberger P. C. & Winn W. C. 1999. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas color. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. Pp 1432.
19. Korolkovas A. & Burckhalter J.H. 1983. Compendio esencial de Química Farmaceutica. Editorial Reverté. España. Pp 550-652.

20. Kumar Y. & Goodfellow M. 2008. Five new members of the *Streptomyces violaceusniger* 16S rRNA gene clado: *Streptomyces castelarensis* sp. nov., comb. nov., *Streptomyces himastatinicus* sp. nov., *Streptomyces mordarskii* sp. nov., *Streptomyces rapamycinicus* sp. nov. and *Streptomyces ruanii* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. Vol. 58: 1369-1378.
21. Labeda D. P., Goodfellow M., Brown R., Ward A. C., Lanoot B., Vannanneyt M., Swings J., Kim S.-B., Liu Z., Chun J., Tamura T., Oguchi A., Kikuchi T., Kikuchi H., Nishii T., Tsuji K., Yamaguchi Y., Tase A., Takahashi M., Sakane T., Suzuki K. I., Hatano K. 2012. Phylogenetic study of the species within the family *Streptomycetaceae*. Antonie van Leeuwenhoek, 101:73–104.
22. Lane, D. J. 1991. 16S/23S sequencing, pp. 115-175. New York, John Wiley and Sons.
23. Logan N. A. 1994. Bacterial Systematics. Blackwell Scientific Publications, Oxford. Pp 272.
24. Madigan M. T., Martinko J. M. & Parker J. 2004. Brock. Biología de los microorganismos. 10ª edición. Pearson Prentice Hall, España. Pp 302-305.
25. Magarvey N.A., Keller J.M., Brennan V., Dworkin M. & Sheman D.H. 2004. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. Applied and Environmental Microbiology, 70:7520-7529.
26. Maldonado L. A., Fragoso-Yáñez D., Pérez-García A., Rosellón-Druker J. & Quintana E. T. 2009. Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico. Antonie van Leeuwenhoek, 95: 111-120.

27. Maldonado L. A., Stach J. E. M., Ward A. C., Bull A. T. & Goodfellow M. 2005. Diversity of cultivable Actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87:11-18.
28. Mincer T. J., Jensen P. R., Kauffman C. A & Fenical W. 2002. Widespread and persistent population of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 61:5005-5011.
29. Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H., Tenover F. C. & Tenover R. H. (Eds). 2003. Manual of Clinical Microbiology, 8<sup>th</sup> Edition. Vol. 1.
30. Neuss N., Molloy B. B., Shah R., & De La Higuera N. 1970. The structure of anticapsin, a new biologically active metabolite of *Streptomyces griseoplanus*. *J. Biochem*, 118; 571-575.
31. Newton C.R., Graham A. 1997. PCR. BIOS Scientific Publishers, Oxford. 2nd edn. Pp 75–84.
32. Ohnishi Y., Ishikawa J., Hara H., Suzuki H., Ikenoya M., Ikeda H., Yamashita A., Hattori M., Horinouchi S. 2008. Genome Sequence of the Streptomycin-Producing Microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J. Bacteriol*, 190(11): 4050-4060.
33. Otani T., Yasuhara T., Minami Y., Shimazu T., Zhang R., Xie M. Y. 1991. Purification and primary structure of C-1027-AG, a selective antagonist of antitumor antibiotic C-1027, from *Streptomyces globisporus*. *Biol Chem*. Vol: 55(2):407-17.
34. Praveen V., Tripathi C-K., Bihari V. & Srivastava S-C. 2008. Production of actinomycin-D by a new isolate, *Streptomyces sindenensis*. *Annals of Microbiology*. Vol. 58 (1): 109-114.
35. Prescott M. L., Harley P.J. & Klein A. D. 1999. Microbiología. Mc Graw Hill Interamericana, Madrid, España. Pp 525-537.

36. E. T., Flores Badillo R. & Maldonado L. A. 2012. Characterisation of the first actinobacterial group isolated from a mexican extremophile environment. *Antonie van Leeuwenhoek* (en prensa).
37. Rodríguez C. 2004. Selective isolation and characterisation of novel members of the family *Streptomycetaceae*. PhD Tesis. University of Newcastle upon Tyne, Newcastle upon Tyne, UK. Pp 53-61.
38. Schleifer K.H, Kandler O. 1972: Peptidoglycan Types of Bacterial Cell Walls and their Taxonomic Implications. *Bacteriol Rev*, 36(4):407-477.
39. Shirling E. B. & Gottlieb D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16:313-340.
40. Shirling E. B. & Gottlieb D. 1968. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces* III. Species descriptions from first and second studies. *Int J Syst Bacteriol*, 18: 279-392.
41. Simone DG Petinate. Influence of Growth Medium in Proteinase and Pigment Production by *Streptomyces cyaneus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* vol. 94 n. 2 Rio de Janeiro Mar/Apr 1.
42. Sneath, P.H.A. 1957. Some thoughts on bacterial classification. *Journal of General Microbiology*, 17:184-200.
43. Sogin M.L., Morrison H.G., Huber J.A., Welch D.M., Huse S.M., Neal P.R., Arrieta J.M. & Herdl G. J. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplorer "rare biosphere". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 32: 12115-12120.
44. Stackebrandt E., Rainey, F. A. & Ward-Rainey, N. L. 1997. Proposal for a New Hierarchic Classification System, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47: 479-491.

45. Staley J.T., Gunsalus R.P., Lory S. & Perry J.J. (eds). 2007. Microbial life. Sinauer Associates Inc.
46. Staneck J.L. & Roberts G.D. 1974. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. Applied Microbiology 28:226-231.
47. Tresner H.D, Backus E.J. 1963. System of color wheels for streptomycete taxonomy. Appl Microbiol. 11:335-338.
48. Uchida K. & Seino A. 1997. Intra- and intergeneric relationships of various actinomycete strains based on the acyl types of the muramyl residue in cell wall peptidoglycans examined in a glycolate test. Int J Syst Bacteriol. 47 (1): 182-190.
49. Uyeda M., Yokomizo K., Miyamoto Y. & Habib E. E. 1998. Fattiviracin A1, a Novel Antiherpetic agent produced by *Streptomyces microflavus* strain No. 2445. The Journal of antibiotics. Vol. 51, No. 9. 823-824.
50. Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald G.F, Chater K.F, Van Sinderen D. 2007. Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. Microbiol Mol Biol Rev. 71 (3): 495-548.
51. Vezina C. 1975. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. J Antibiot. Vol. 28: 721-726.
52. Volff J.N. & Altenbuchner J. 2000. A new beginning with new ends: linearization of circular chromosomes during bacterial evolution. FEMS Microbiol Lett. 186 (2): 143-50.
53. Waksman, A.S. & Henrici, T.A. 1943. The nomenclature and classification of the *Actinomycetes*. Journal of bacteriology. 46(4): 337-341.

54. Yokomizo K., Miyamoto Y., Nagao K., Kumagae E., Habib E.E., Suzuki K., Harada S., Uyeda M. 1998. Fattiviracin A1, a novel antiviral agent produced by Streptomyces microflavus strain No. 2445 II. Biological properties. The Journal of antibiotics. Vol. 51, No. 11. 1035-1039.
55. Zhu H-H., Yao Q., Yang S-Z., Li Z-K. & Guo J. 2011. Streptomyces lacticiproducens sp. nov., a lactic acid-producing streptomycete isolated from the rhizosphere of tomato plants. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 61, 35–39.

## 10. ANEXOS

### 10.1. Medios de cultivo

#### Agar arroz

- 50.0 g de arroz
- 0.5 mL de soluciones traza
- 6.0 g de agar
- 500 mL de agua bidestilada
- pH 7.0-7.2

#### Agar avena (OA)

- 20.0 g de avena
- 1.0 mL de solución de sales traza
- 12.0 g de agar
- 1000 mL de agua bidestilada
- pH 7.0-7.2

#### Medio basal

- 10.0 g de glucosa
- 0.5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0.5 g de NaCl
- 0.01 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 1.0 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$
- 12 g de agar
- 1000 mL de agua bidestilada
- pH 7.0-7.2

**Agar Bennett's**

- 10 g de Lab-Lemco
- 2 g de peptona
- 2 g de extracto de levadura
- 2 g de triptosa
- 10 g de glucosa
- 400 mg de almidón
- 400 mg de  $\text{CaCO}_3$
- Trazas de  $\text{CoCl}_2$
- Trazas de Citrato Férrico de amonio
- 12 g de agar
- 1000 mL de agua bidestilada
- pH 7.0-7.2

**Agar Bennett's modificado**

- 0.8 g de Lab-Lemco
- 1.0 g de extracto de levadura
- 2.0 g de Bacto-Caseina
- 10.0 g de glucosa
- 12 g de agar
- 1000 mL de agua bidestilada
- pH 7.0-7.2

**Agar GYEA**

- 10 g de glucosa
- 10 g de extracto de levadura
- 12 g de agar
- 1000 mL de agua bidestilada
- pH 7.0-7.2

**Agar GYM**

- 4.0 g de glucosa
- 4.0 g de extracto de levadura
- 10.0 g de extracto de malta
- 2.0 g de  $\text{CaCO}_3$
- 12.0 g de agar
- 1000 mL de agua bidestilada
- pH 7.0-7.2 (ajustar pH solo con KOH)

**ISP-9**

- 2.64 g de  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$
- 2.38 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
- 1.0 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 1 mL de solución de sales traza
- 12 g de agar
- 1000 mL de agua bidestilada
- pH 6.8-7.0

**Agar Non-sporulating (NS)**

- 20 g de casa-aminoácidos
- 20 g de almidón soluble
- 4 g de extracto de levadura
- 12 g de agar
- 1000 mL de agua bidestilada
- pH 7.0-7.2

**Agar YEME**

- 3.0 g de extracto de levadura
- 3.0 g de extracto de malta
- 5.0 g de bactopectona
- 10.0 g de glucosa
- 12.0 g de agar
- 1000 mL de agua bidestilada
- pH 7.0-7.2

## 10.2. Soluciones y reactivos

### GTE

- 2.27 mL de glucosa al 40%
- 2.0 mL de EDTA 0.5 M, pH 8
- 2.5 ml de Tris- HCl pH 8
- 93.23 mL de agua desionizada para un volumen final de 100 mL

### Solución de sales traza (Pridham y Gottlieb)

- 1.28 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 0.22 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 1.58 d de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- 0.3 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 200 mL de agua bidestilada

### Solución amortiguadora de TBE

- 11.16 g de Tris base
- 8.42 gr de ácido bórico
- 0.98 g de EDTA sódico
- 1000 mL de agua destilada
- Se esteriliza en la autoclave

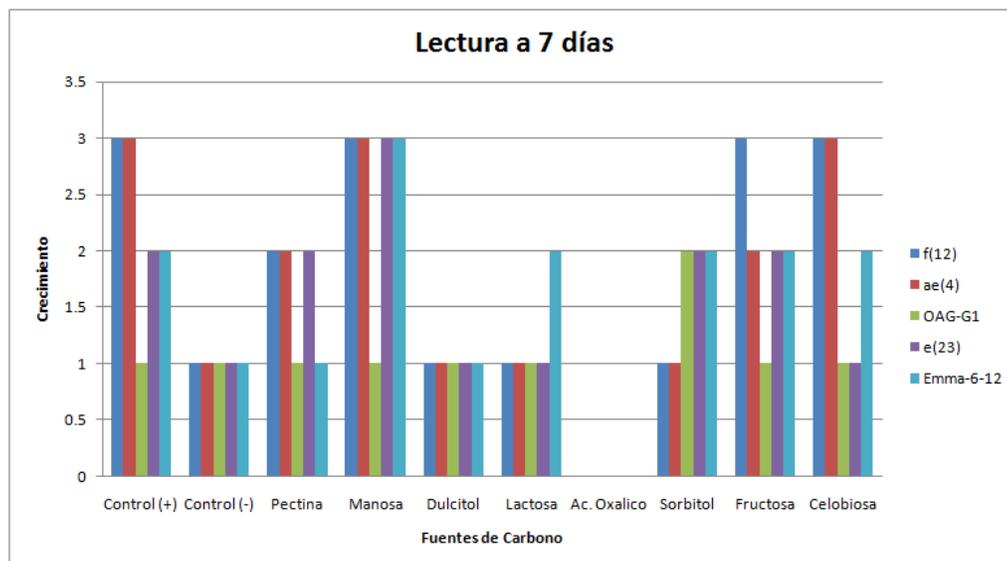
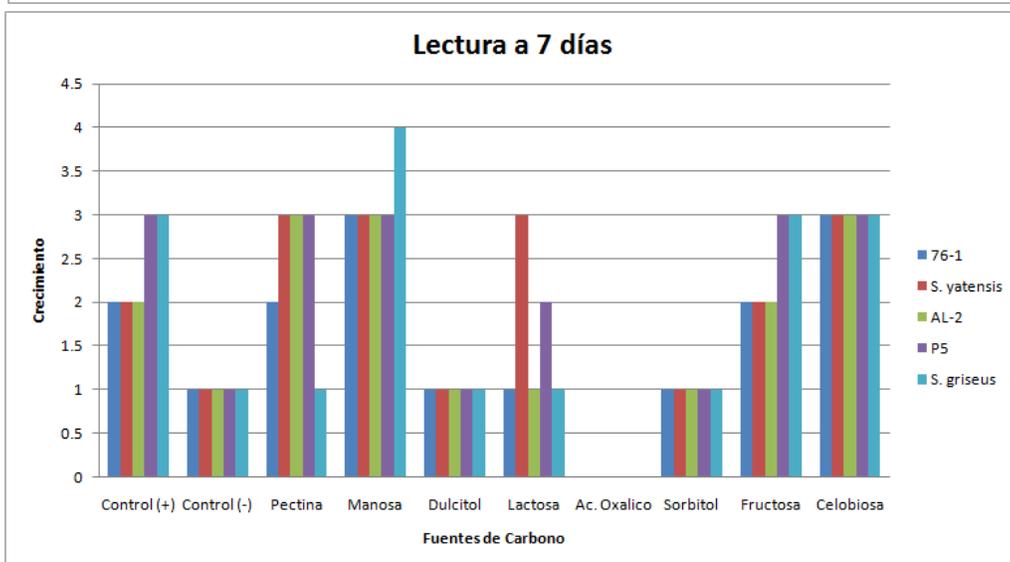
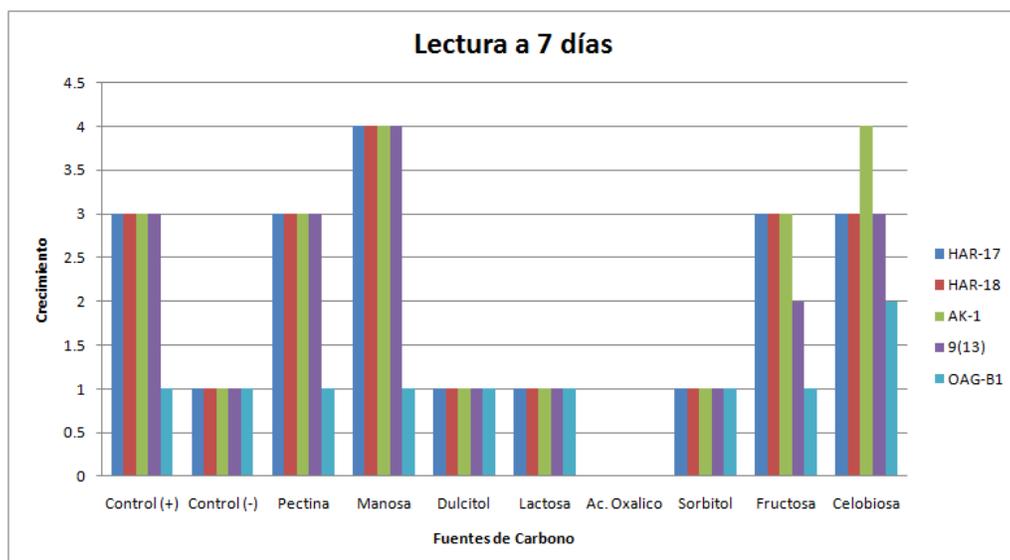
### Estándares de McFarland

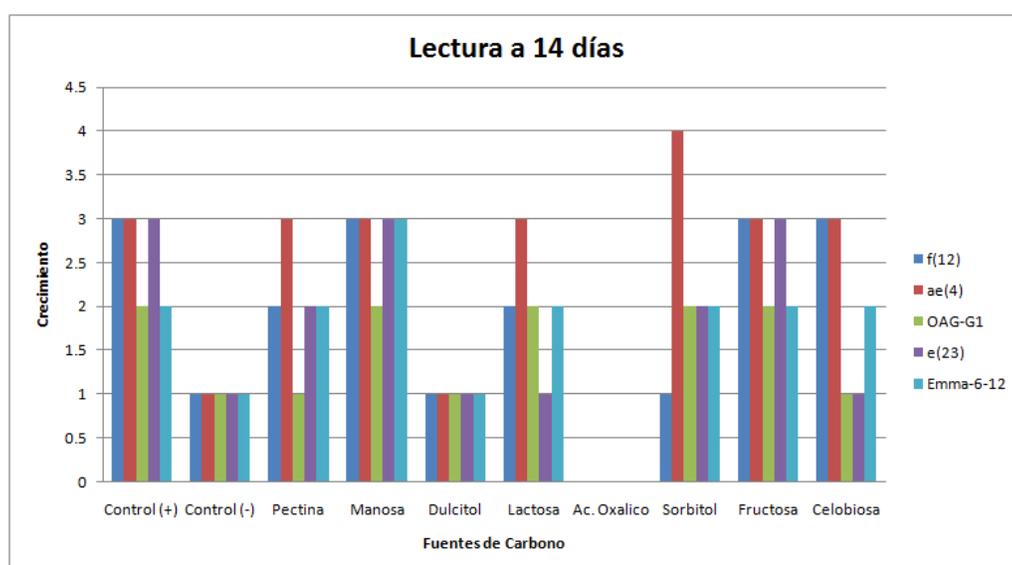
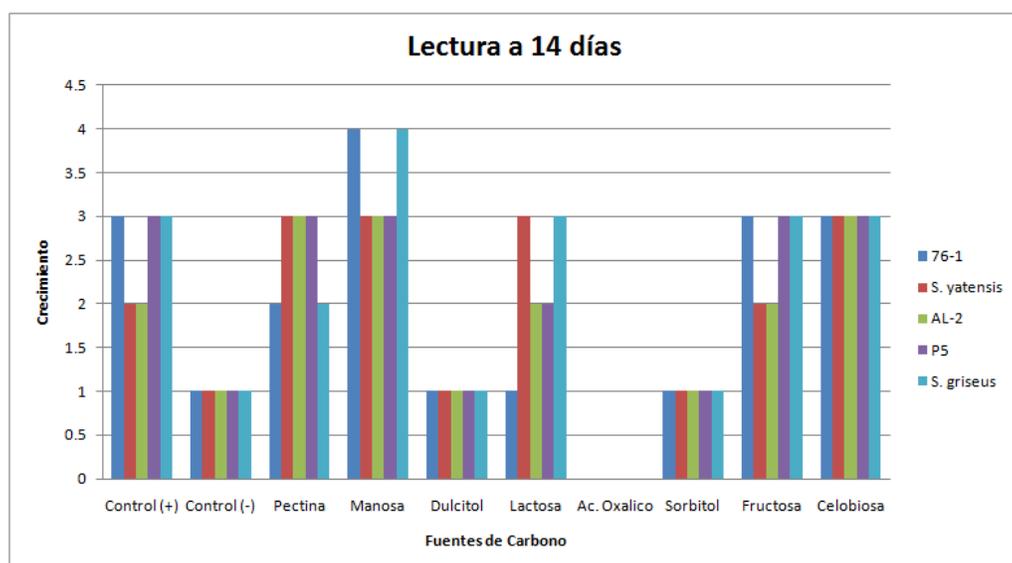
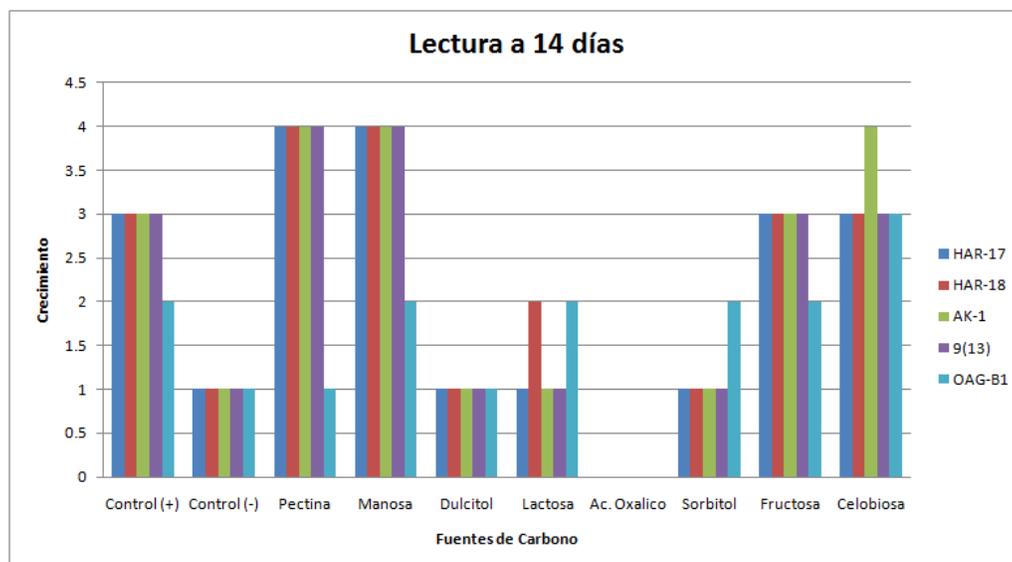
1. Se prepara una solución de  $\text{BaCl}_2$  (SIGMA) al 1% y otra de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  puro (BAKER) al 1%.
2. Estas 2 soluciones se ponen en las cantidades establecidas e acuerdo a la tabla ¿. Y se mezclan perfectamente en tubos de ensaye de rosca.
3. La densidad de cada tubo corresponde a la densidad de las suspensiones microbianas, indicadas en la tabla A.

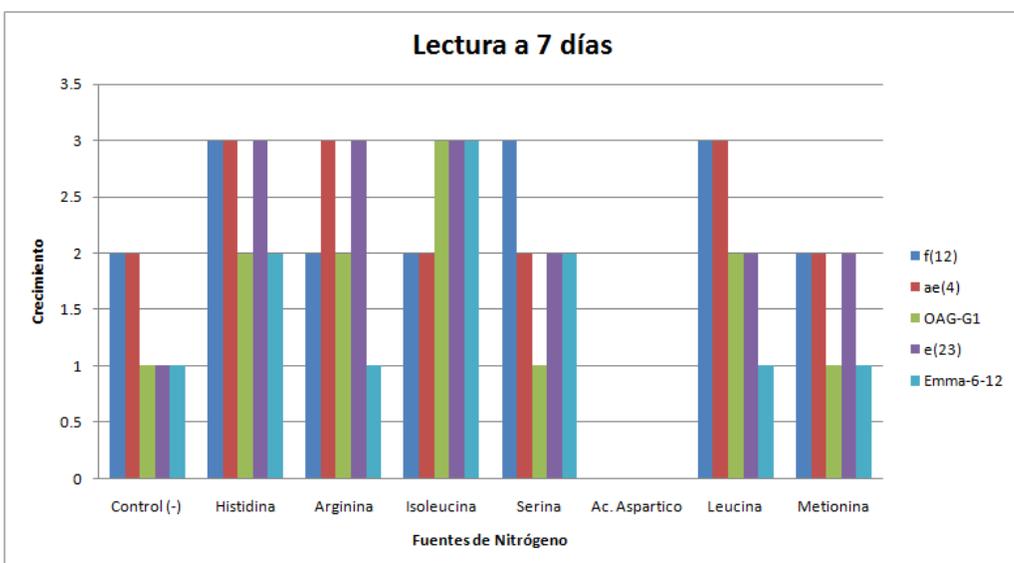
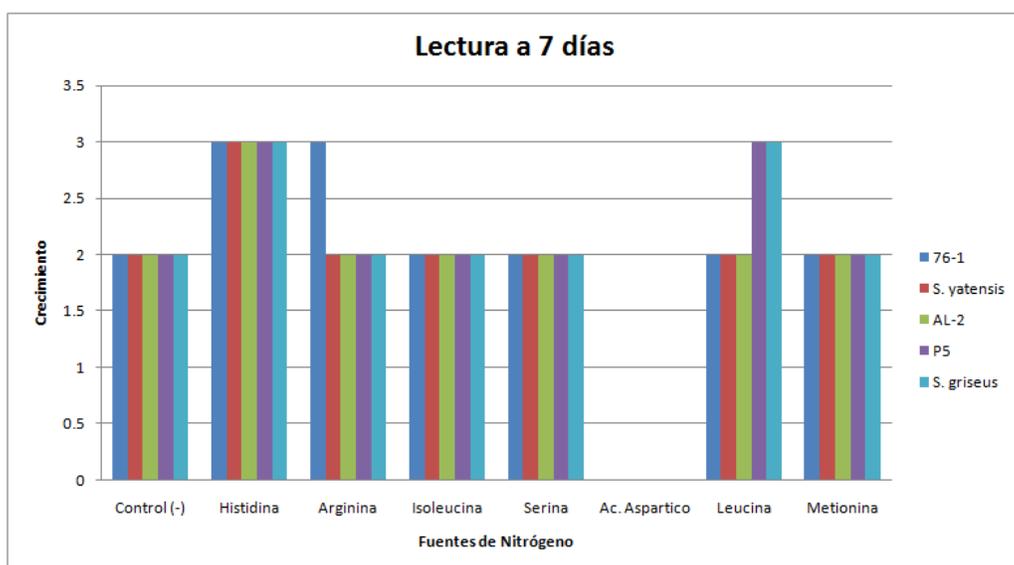
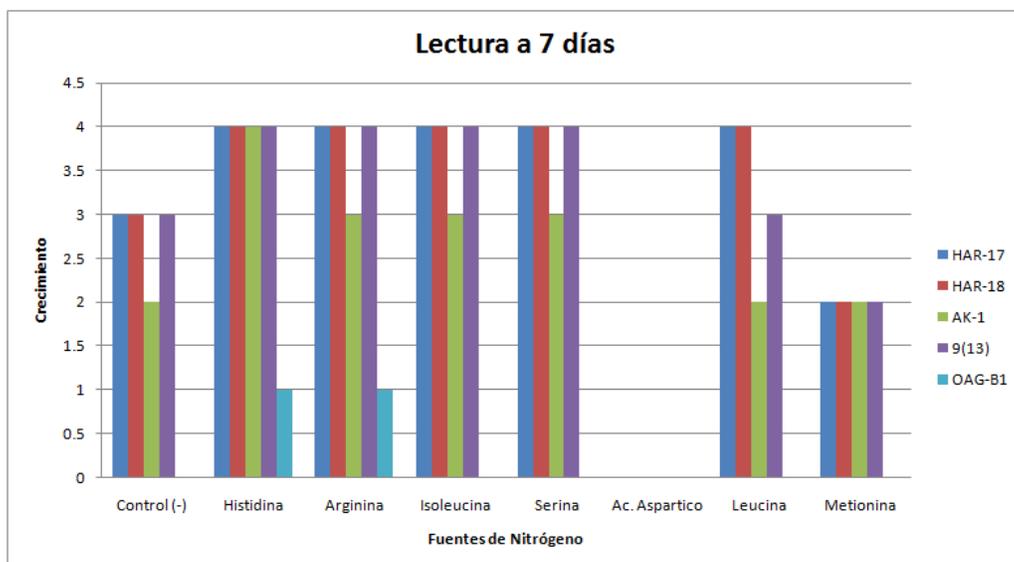
Estándar	Volumen BaCl <sub>2</sub> 1% (mL)	Volumen H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1% (mL)	Suspensión Bacteriana correspondiente (10 <sup>8</sup> UFC/mL)
0.5	0.05	9.95	1.5
1	0.1	9.9	3
2	0.2	9.8	6
3	0.3	9.7	9
4	0.4	9.6	12
5	0.5	9.5	15
6	0.6	9.4	18
7	0.7	9.3	21
8	0.8	9.2	24
9	0.9	9.1	27
10	1.0	9.0	30

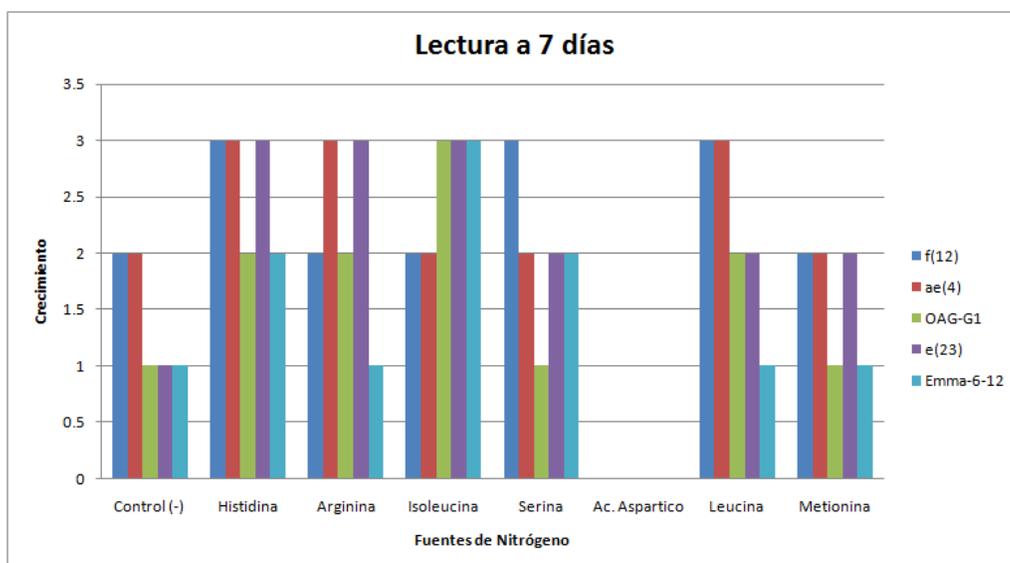
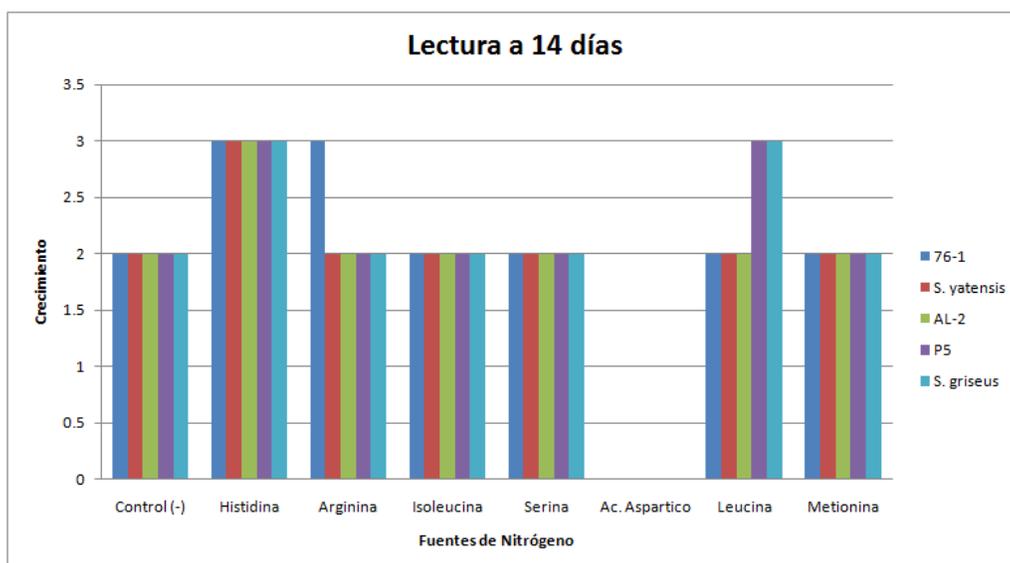
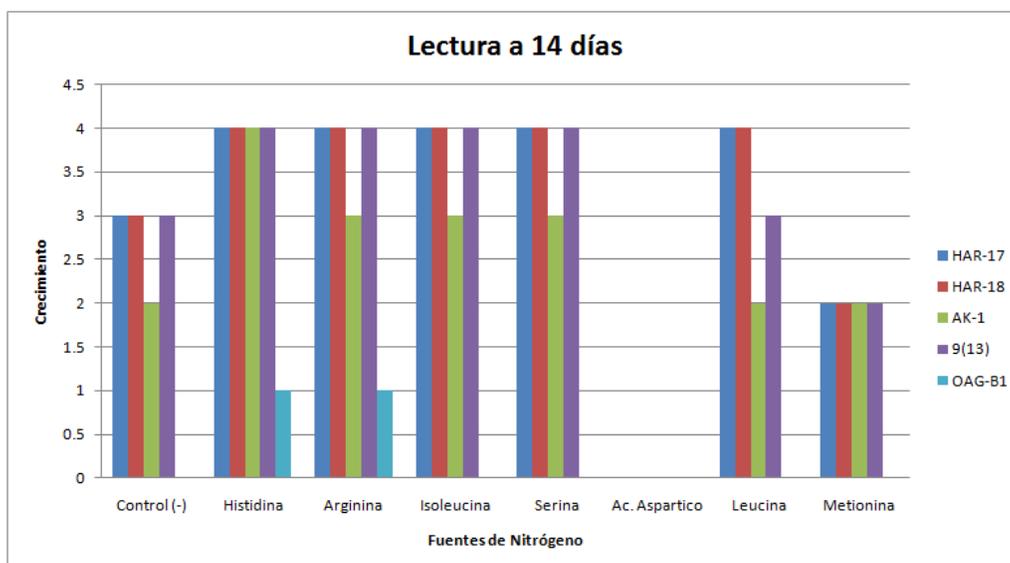
**Tabla A.** Relación entre los estándares de McFarland y la suspensión bacteriana. (Murray *et al*, 2003)

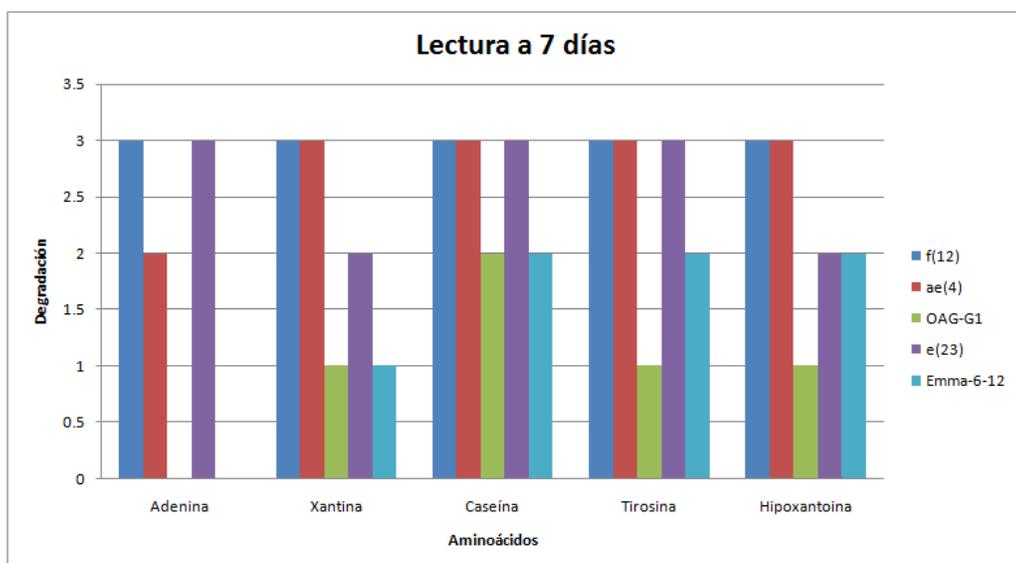
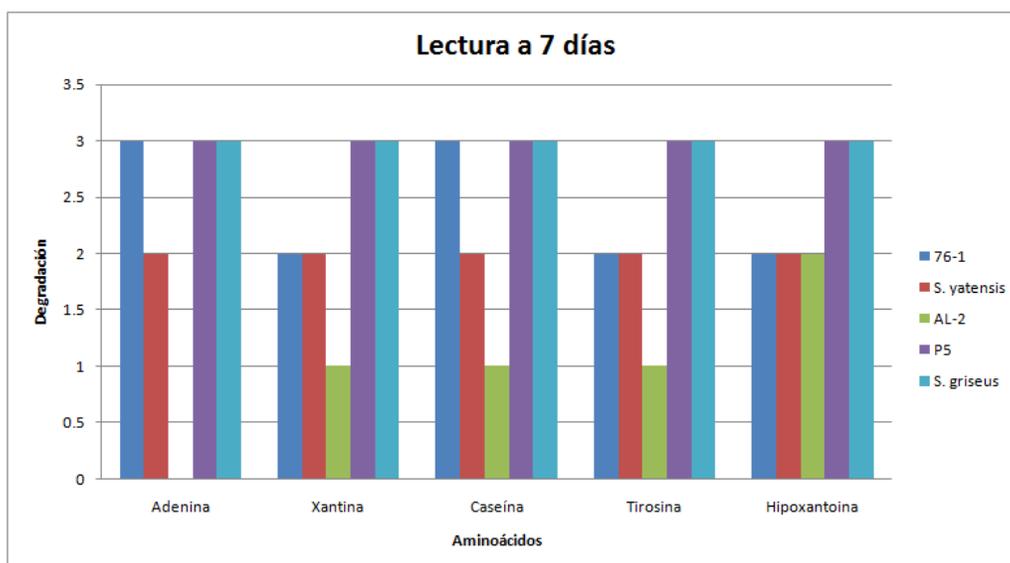
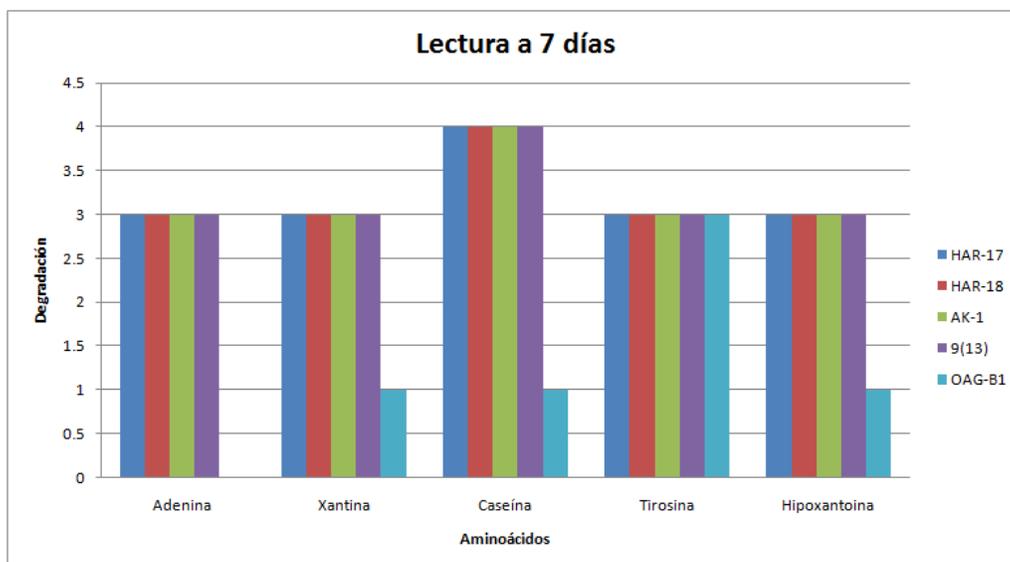
### 10.3. Gráficas de crecimiento de fuentes de carbono, nitrógeno y degradación de aminoácidos a 7 y 14 días

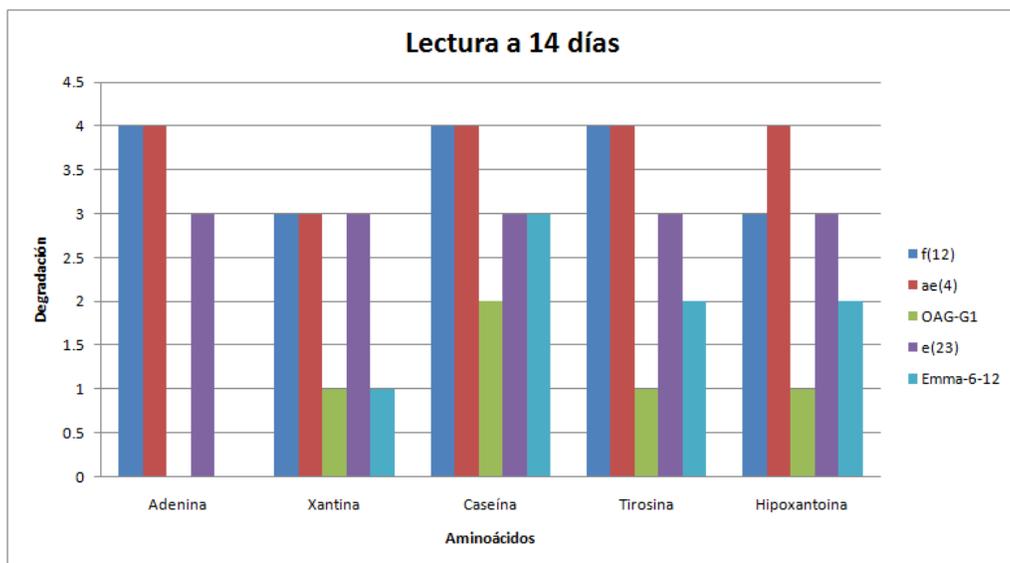
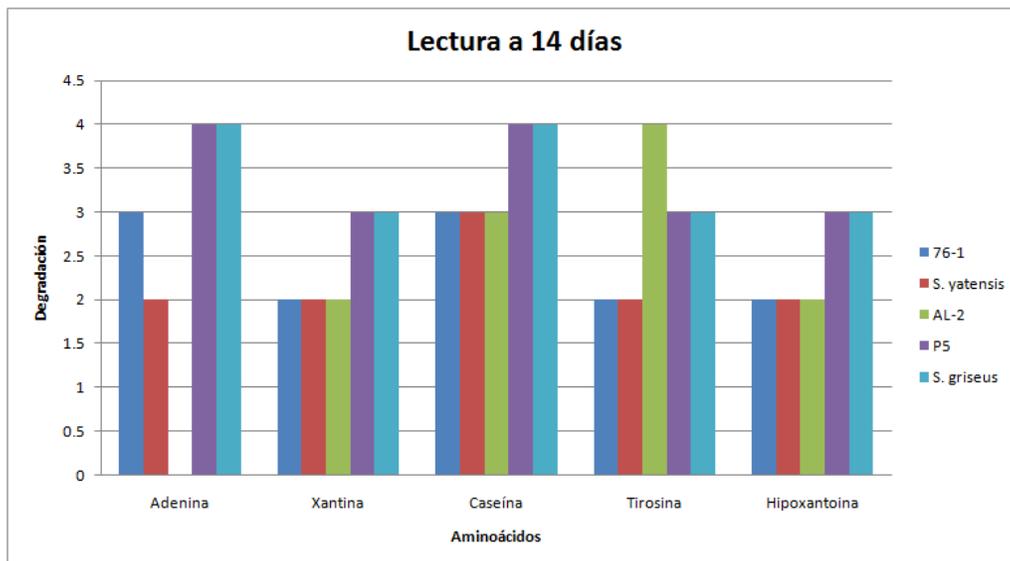
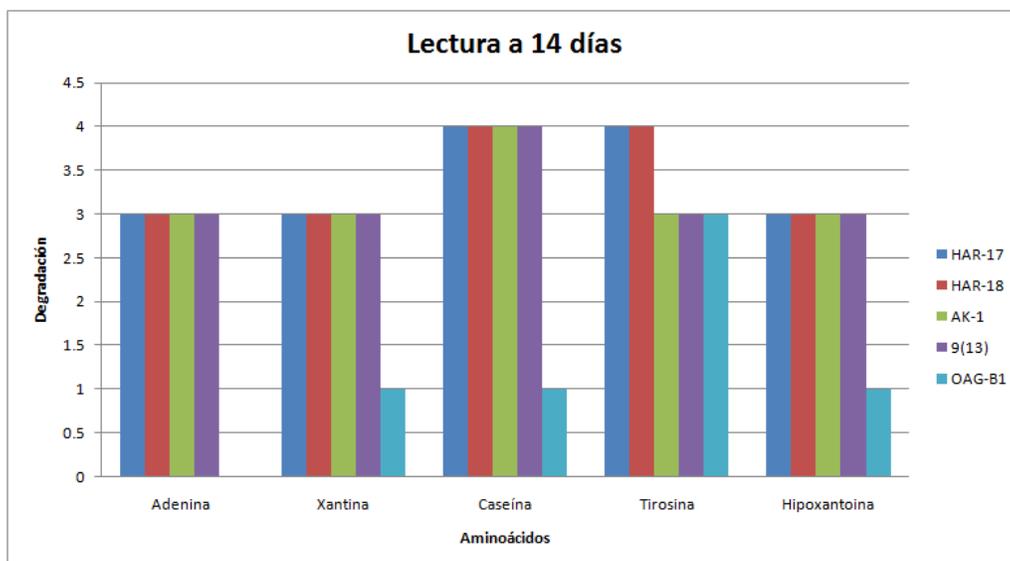












## 10.4. Resultados del BLAST para cada uno de los aislados

### 10.4.1. Aislado 9(13)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage
AB184079.2	Streptomyces lavendulae subsp. lavendulae gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 12342	1548	1548	87%
<a href="#">HQ660584.1</a>	Streptomyces sp. enrichment culture clone A01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1543</a>	1543	87%
<a href="#">GQ863909.1</a>	Streptomyces sp. HB138 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1543</a>	1543	87%
<a href="#">FJ946591.1</a>	Uncultured Streptomyces sp. clone ESS-E2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1543</a>	1543	87%
<a href="#">EU647498.1</a>	Streptomyces griseus subsp. griseus strain 10/ppi 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1543</a>	1543	87%
<a href="#">EU647483.1</a>	Streptomyces exfoliatus strain Malaysia 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1543</a>	1543	87%
<a href="#">EU647470.1</a>	Streptomyces sp. PRL 1642 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1543</a>	1543	87%
<a href="#">EU430555.1</a>	Streptomyces sp. VTT E-062982 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1543</a>	1543	87%
<a href="#">EU430554.1</a>	Streptomyces sp. VTT E-062980 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1543</a>	1543	87%
<a href="#">EU430553.1</a>	Streptomyces sp. VTT E-062973 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1543</a>	1543	87%
<a href="#">FJ429552.1</a>	Uncultured Streptomyces sp. clone 889 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1543</a>	1543	87%
<a href="#">EF093122.1</a>	Streptomyces sp. VTT E-042674 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	<a href="#">1543</a>	1543	87%
<a href="#">EF093120.1</a>	Streptomyces sp. VTT E-042667 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	<a href="#">1543</a>	1543	87%
<a href="#">EF093119.1</a>	Streptomyces sp. VTT E-042647 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	<a href="#">1543</a>	1543	87%
<a href="#">EF093118.1</a>	Streptomyces sp. VTT E-042644 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	<a href="#">1543</a>	1543	87%
<a href="#">EF093117.1</a>	Streptomyces sp. VTT E-042638 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	<a href="#">1543</a>	1543	87%
<a href="#">EF688620.1</a>	Streptomyces flavolimosus strain CGMCC 2027 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1543</a>	1543	87%
<a href="#">DQ026671.1</a>	Streptomyces cavourensis subsp. washingtonensis strain NRRL B-8030 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1543</a>	1543	87%
<a href="#">DQ507205.1</a>	Streptomyces sp. MTR1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1543</a>	1543	87%
<a href="#">AY754722.1</a>	Streptomyces sp. N0130 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1543</a>	1543	87%

### 10.4.2. Aislado ae(4)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage
<a href="#">EU430553.1</a>	Streptomyces sp. VTT E-062973 16S ribosomal RNA gene, p	<a href="#">2379</a>	2379	95%
<a href="#">EF093118.1</a>	Streptomyces sp. VTT E-042644 16S ribosomal RNA gene, c	<a href="#">2379</a>	2379	95%
<a href="#">EF688620.1</a>	Streptomyces flavolimosus strain CGMCC 2027 16S ribosom	<a href="#">2379</a>	2379	95%
<a href="#">AF389344.1</a>	Streptomyces sp. YIM8 16S ribosomal RNA gene, partial seq	<a href="#">2379</a>	2379	95%
<a href="#">EU430555.1</a>	Streptomyces sp. VTT E-062982 16S ribosomal RNA gene, p	<a href="#">2377</a>	2377	95%
<a href="#">EU430554.1</a>	Streptomyces sp. VTT E-062980 16S ribosomal RNA gene, p	<a href="#">2377</a>	2377	95%
<a href="#">CP002475.1</a>	Streptomyces flavogriseus ATCC 33331, complete genome	<a href="#">2374</a>	1.421e+04	95%
<a href="#">HQ597007.1</a>	Streptomyces griseus strain ABRIINW 13 16S ribosomal RNA	<a href="#">2374</a>	2374	95%
<a href="#">GU045532.1</a>	Streptomyces sp. SXY49 16S ribosomal RNA gene, partial s	<a href="#">2374</a>	2374	95%
<a href="#">HQ660584.1</a>	Streptomyces sp. enrichment culture clone A01 16S ribosom	<a href="#">2370</a>	2370	94%
<a href="#">AB448712.1</a>	Streptomyces sp. TRI-3 gene for 16S ribosomal RNA, partia	<a href="#">2370</a>	2370	95%
<a href="#">FJ429552.1</a>	Uncultured Streptomyces sp. clone 889 16S ribosomal RNA	<a href="#">2370</a>	2370	95%
<a href="#">EF093122.1</a>	Streptomyces sp. VTT E-042674 16S ribosomal RNA gene, c	<a href="#">2370</a>	2370	95%
<a href="#">EF093120.1</a>	Streptomyces sp. VTT E-042667 16S ribosomal RNA gene, c	<a href="#">2370</a>	2370	94%
<a href="#">DQ026671.1</a>	Streptomyces cavourensis subsp. washingtonensis strain NI	<a href="#">2370</a>	2370	94%
<a href="#">HQ392466.1</a>	Streptomyces sp. OE11 16S ribosomal RNA gene, partial seq	<a href="#">2368</a>	2368	95%

## 10.4.3. Aislado AK-1

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage
<a href="#">HQ711933.1</a>	Streptomyces carpaticus strain BTSS-501 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1709</a>	1709	90%
<a href="#">AY944260.1</a>	Actinomycetales bacterium C14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1709</a>	1709	90%
<a href="#">FJ853198.1</a>	Streptomyces sp. DRL40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1707</a>	1707	90%
<a href="#">EU741186.1</a>	Streptomyces sp. 13658G 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1703</a>	1703	90%
<a href="#">EU714248.1</a>	Streptomyces sp. AK1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1703</a>	1703	90%
<a href="#">EU368812.1</a>	Streptomyces sp. A406 Ydz-HN 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1703</a>	1703	90%
<a href="#">EF012115.1</a>	Streptomyces sp. 1A01564 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1703</a>	1703	90%
<a href="#">DQ416192.1</a>	Streptomyces sp. 0616203 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1701</a>	1701	89%
<a href="#">FJ842688.1</a>	Streptomyces sp. GW14-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1700</a>	1700	90%
<a href="#">GU130105.1</a>	Streptomyces sp. 0614149 clone 105T3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1698</a>	1698	90%
<a href="#">EU384266.1</a>	Actinomycetales bacterium A535 Ydz-FQ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1698</a>	1698	89%
<a href="#">EU181239.1</a>	Streptomyces sp. 102H11-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1698</a>	1698	90%
<a href="#">HQ386729.1</a>	Streptomyces sp. SFKS-14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1692</a>	1692	90%
<a href="#">GU130104.1</a>	Streptomyces sp. 172221 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1692</a>	1692	90%
<a href="#">AY660018.1</a>	Streptomyces sp. 050642 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1687</a>	1687	90%

## 10.4.4. Aislado AL-2

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage
<a href="#">EU714252.1</a>	Streptomyces sp. AR1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">2614</a>	2614	94%
<a href="#">EU741227.1</a>	Streptomyces sp. 13674L 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">2586</a>	2586	94%
<a href="#">EU714246.1</a>	Streptomyces sp. AG1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">2582</a>	2582	93%
<a href="#">AB373974.1</a>	Streptomyces sp. KS21 gene for 16S ribosomal RNA	<a href="#">2571</a>	2571	93%
<a href="#">AY464538.1</a>	Streptomycetaceae bacterium CNQ703 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">2567</a>	2567	93%
<a href="#">AY464537.1</a>	Streptomycetaceae bacterium CNQ695 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">2567</a>	2567	93%
<a href="#">AB373973.1</a>	Streptomyces sp. KS20 gene for 16S ribosomal RNA	<a href="#">2566</a>	2566	93%
<a href="#">AY464539.1</a>	Streptomycetaceae bacterium CNQ732 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">2556</a>	2556	93%
<a href="#">AM398645.1</a>	Streptomyces hainanensis partial 16S rRNA gene, type strain YIM47672T	<a href="#">2549</a>	2549	93%
<a href="#">DQ026665.1</a>	Streptomyces phaeopurpureus strain NRRL B-2258 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">2549</a>	2549	94%
<a href="#">AB373965.1</a>	Streptomyces sp. KS09 gene for 16S ribosomal RNA	<a href="#">2545</a>	2545	94%
<a href="#">AB373963.1</a>	Streptomyces sp. KS06 gene for 16S ribosomal RNA	<a href="#">2540</a>	2540	92%
<a href="#">AB373980.1</a>	Streptomyces sp. KS30 gene for 16S ribosomal RNA	<a href="#">2536</a>	2536	92%

## 10.4.5. Aislado e(23)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage
<a href="#">EU135661.1</a>	Streptomyces sp. YIM C630 16S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">1760</a>	1760	93%
<a href="#">HQ238390.1</a>	Streptomyces halstedii strain G8A-25 16S ribosomal RNA gene	<a href="#">1759</a>	1759	93%
<a href="#">JN408757.1</a>	Streptomyces sp. BF-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1757</a>	1757	93%
<a href="#">GU550585.1</a>	Streptomyces sp. I08A-00426 16S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">1757</a>	1757	93%
<a href="#">GU550579.1</a>	Streptomyces sp. I08A-00376 16S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">1757</a>	1757	93%
<a href="#">JN180196.1</a>	Streptomyces microflavus strain 126182 16S ribosomal RNA gene	<a href="#">1753</a>	1753	93%
<a href="#">HQ660584.1</a>	Streptomyces sp. enrichment culture clone A01 16S ribosomal RNA	<a href="#">1753</a>	1753	93%
<a href="#">HQ611048.1</a>	Streptomyces sp. ZX10-01 16S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">1753</a>	1753	93%
<a href="#">GQ863909.1</a>	Streptomyces sp. HB138 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1753</a>	1753	93%
<a href="#">FJ946591.1</a>	Uncultured Streptomyces sp. clone ESS-E2 16S ribosomal RNA	<a href="#">1753</a>	1753	93%
<a href="#">GU214752.1</a>	Streptomyces sp. 22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1753</a>	1753	93%
<a href="#">EU647498.1</a>	Streptomyces griseus subsp. griseus strain 10/ppi 16S ribosomal	<a href="#">1753</a>	1753	93%
<a href="#">EU647483.1</a>	Streptomyces exfoliatus strain Malaysia 16S ribosomal RNA	<a href="#">1753</a>	1753	93%
<a href="#">EU647470.1</a>	Streptomyces sp. PRL 1642 16S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">1753</a>	1753	93%
<a href="#">EU430555.1</a>	Streptomyces sp. VTT E-062982 16S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">1753</a>	1753	93%

## 10.4.6. Aislado Emma-6-12

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage
<a href="#">JQ073731.1</a>	Nonomuraea sp. NEAU-Z6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1777</a>	1777	98%
<a href="#">EU841591.1</a>	Nonomuraea roseola strain HBUM174540 16S ribosomal RNA gene	<a href="#">1753</a>	1753	96%
<a href="#">HM755723.1</a>	Nonomuraea sp. YIM 67092 16S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">1749</a>	1749	98%
<a href="#">GU367193.1</a>	Nonomuraea sp. YIM 65586 16S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">1740</a>	1740	95%
<a href="#">FJ347524.1</a>	Nonomuraea sp. PT708 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1727</a>	1727	94%
<a href="#">FN356742.1</a>	Nonomuraea sp. GW 12687 partial 16S rRNA gene, type strain	<a href="#">1716</a>	1716	96%
<a href="#">HM368636.1</a>	Nonomuraea kuesteri strain XMU289 16S ribosomal RNA gene	<a href="#">1714</a>	1714	98%
<a href="#">HM368621.1</a>	Nonomuraea rubescens strain XMU207 16S ribosomal RNA gene	<a href="#">1709</a>	1709	98%
<a href="#">NR_042020.1</a>	Nonomuraea roseola strain DSM 43767 16S ribosomal RNA, complete	<a href="#">1709</a>	1709	97%
<a href="#">AJ278220.1</a>	Sebekia benihana 16S rRNA gene for 16S ribosomal RNA, strain	<a href="#">1709</a>	1709	97%
<a href="#">FJ486410.1</a>	Nonomuraea roseola strain HBUM175028 16S ribosomal RNA	<a href="#">1705</a>	1705	96%
<a href="#">AB622256.1</a>	Nonomuraea sp. CA17 gene for 16S rRNA, partial sequence	<a href="#">1698</a>	1698	98%
<a href="#">NR_043688.1</a>	Nonomuraea candida strain HMC10 16S ribosomal RNA, partial	<a href="#">1698</a>	1698	98%
<a href="#">AJ294350.1</a>	Sebekia benihana partial 16S rRNA gene, strain NRRL 11111	<a href="#">1696</a>	1696	98%

## 10.4.7. Aislado f(12)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage
<a href="#">FR837631.1</a>	<i>Streptomyces pluricoreoscens</i> partial 16S rRNA gene, strain NAPOLSKAYA1, isolate 2	1853	1853	99%
<a href="#">FR837629.1</a>	<i>Streptomyces pluricoreoscens</i> partial 16S rRNA gene, strain IVANOVA1, isolate 1	1853	1853	99%
<a href="#">GQ863918.1</a>	<i>Streptomyces</i> sp. HB202 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1853	1853	99%
<a href="#">HM018074.1</a>	<i>Streptomyces</i> sp. WAL03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1853	1853	99%
<a href="#">AB184240.2</a>	<i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 12912	1853	1853	99%
<a href="#">EF063480.1</a>	<i>Streptomyces</i> sp. B-22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1853	1853	99%
<a href="#">AF429390.1</a>	<i>Streptomyces</i> sp. VTT E-99-1326 (A4) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1853	1853	99%
<a href="#">DQ663181.1</a>	<i>Streptomyces</i> sp. 344I-130 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1851	1851	99%
<a href="#">AB184205.1</a>	<i>Streptomyces griseinus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 12869	1851	1851	99%
<a href="#">AB184203.1</a>	<i>Streptomyces globisporus</i> subsp. <i>globisporus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 12867	1851	1851	99%
<a href="#">EF178686.1</a>	<i>Streptomyces globisporus</i> subsp. <i>globisporus</i> strain NRRL B-2872 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1849	1849	99%
<a href="#">DQ442540.1</a>	<i>Streptomyces pluricoreoscens</i> strain NRRL B-2121T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1849	1849	99%
<a href="#">AB184162.1</a>	<i>Streptomyces pluricoreoscens</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 12808	1849	1849	98%
<a href="#">DQ144216.1</a>	Actinomycetales bacterium HPA135 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1849	1849	99%
<a href="#">AJ781354.1</a>	<i>Streptomyces mediolani</i> 16S rRNA gene, type strain LMG 20093	1849	1849	99%
<a href="#">CP002475.1</a>	<i>Streptomyces flavogriseus</i> ATCC 33331, complete genome	1847	1.105e+04	99%

## 10.4.8. Aislado HAR-17

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage
<a href="#">GQ213972.1</a>	<i>Streptomyces</i> sp. NE9U 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2449	2449	92%
<a href="#">EJ080944.1</a>	<i>Streptomyces</i> sp. ME02-6979.5a 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2449	2449	92%
<a href="#">EJ080943.1</a>	<i>Streptomyces</i> sp. ME02-6979.3a 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2449	2449	92%
<a href="#">AB184756.1</a>	<i>Streptomyces parvus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 3388	2449	2449	91%
<a href="#">AB184114.1</a>	<i>Streptomyces badius</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 12745	2449	2449	91%
<a href="#">AY999783.1</a>	<i>Streptomyces badius</i> strain NRRL B-2567 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2449	2449	91%
<a href="#">D63872.1</a>	<i>Streptomyces setonii</i> 16S ribosomal RNA, complete sequence	2449	2449	92%
<a href="#">GQ863910.1</a>	<i>Streptomyces</i> sp. HB140 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2446	2446	90%
<a href="#">AB184759.1</a>	<i>Streptomyces sindenensis</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 3399	2446	2446	91%
<a href="#">EJ741140.1</a>	<i>Streptomyces parvus</i> strain 13647J 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2444	2444	91%
<a href="#">EJ430547.1</a>	<i>Streptomyces</i> sp. VTT E-062984 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2444	2444	91%
<a href="#">EJ080947.1</a>	<i>Streptomyces</i> sp. ME02-6986B 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2444	2444	92%
<a href="#">EJ080940.1</a>	<i>Streptomyces</i> sp. ID01-15b 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2444	2444	92%
<a href="#">DQ442537.1</a>	<i>Streptomyces parvus</i> strain NRRL B-1455T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2444	2444	91%
<a href="#">AB249935.1</a>	<i>Streptomyces flavofuscus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 100768	2444	2444	91%
<a href="#">AB184741.1</a>	<i>Streptomyces albus</i> subsp. <i>albus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 3195	2444	2444	91%
<a href="#">AB184615.1</a>	<i>Streptomyces baamensis</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 14727	2444	2444	91%

## 10.4.9. Aislado HAR-18

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage
<a href="#">GQ213972.1</a>	Streptomyces sp. NEAU 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2449	2449	92%
<a href="#">EU080944.1</a>	Streptomyces sp. ME02-6979.5a 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2449	2449	92%
<a href="#">EU080943.1</a>	Streptomyces sp. ME02-6979.3a 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2449	2449	92%
<a href="#">AB184756.1</a>	Streptomyces parvus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC3388	2449	2449	91%
<a href="#">AB184114.1</a>	Streptomyces badius gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 12745	2449	2449	91%
<a href="#">AY999783.1</a>	Streptomyces badius strain NRRL B-2567 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2449	2449	91%
<a href="#">D63872.1</a>	Streptomyces setonii 16S ribosomal RNA, complete sequence	2449	2449	92%
<a href="#">GQ863910.1</a>	Streptomyces sp. HB140 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2446	2446	90%
<a href="#">AB184759.1</a>	Streptomyces sindenensis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC3399	2446	2446	91%
<a href="#">EU741140.1</a>	Streptomyces parvus strain 13647J 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2444	2444	91%
<a href="#">EU430547.1</a>	Streptomyces sp. VTT E-062984 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2444	2444	91%
<a href="#">EU080947.1</a>	Streptomyces sp. ME02-6986B 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2444	2444	92%
<a href="#">EU080940.1</a>	Streptomyces sp. ID01-15b 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2444	2444	92%
<a href="#">DQ442537.1</a>	Streptomyces parvus strain NRRL B-1455T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2444	2444	91%
<a href="#">AB249935.1</a>	Streptomyces flavofuscus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 100768	2444	2444	91%
<a href="#">AB184741.1</a>	Streptomyces albus subsp. albus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC3195	2444	2444	91%
<a href="#">AB184615.1</a>	Streptomyces baamensis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 14727	2444	2444	91%

## 10.4.10. Aislado OAG-B1

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage
<a href="#">EU116310.1</a>	Streptomyces sp. CNQ-418 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2364	2364	94%
<a href="#">EF470589.1</a>	Streptomyces sp. NPS-8920 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2359	2359	96%
<a href="#">EU741227.1</a>	Streptomyces sp. 13674L 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2346	2346	95%
<a href="#">FJ842613.1</a>	Streptomyces sp. 042403 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2346	2346	96%
<a href="#">EU741230.1</a>	Streptomyces sp. 13674O 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2344	2344	95%
<a href="#">EU741187.1</a>	Streptomyces sp. 13658H 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2340	2340	95%
<a href="#">EU741186.1</a>	Streptomyces sp. 13658G 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2335	2335	95%
<a href="#">EU714252.1</a>	Streptomyces sp. AR1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2331	2331	93%
<a href="#">EF551062.1</a>	Streptomyces sp. NPS-12745 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2329	2329	96%
<a href="#">NR_025615.1</a>	Streptomyces albus subsp. albus strain DSM 40313 16S ribosomal RNA, partial sequence >emb AJ621602.2  Streptomyces albus subsp. albus 16S rRNA gene, type strain DSM 40313T	2326	2326	94%
<a href="#">AB373965.1</a>	Streptomyces sp. KS09 gene for 16S ribosomal RNA	2324	2324	95%
<a href="#">AB184115.1</a>	Streptomyces cacaoi subsp. cacaoi gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 12748	2324	2324	94%
<a href="#">AY236339.1</a>	Streptomyces sodiiphilus strain YIM 80305 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2320	2320	94%

## 10.4.11. Aislado OAG-G1

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage
<a href="#">AJ420141.1</a>	<i>Actinomadura viridis</i> 16S rRNA gene, strain DSM 43175T	2532	2532	88%
<a href="#">D85467.1</a>	<i>Actinomadura viridis</i> gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	2501	2501	89%
<a href="#">AB331652.1</a>	<i>Actinomadura bangladeshensis</i> gene for 16S rRNA, partial sequence	2470	2470	90%
<a href="#">AB364596.1</a>	<i>Actinomadura vinacea</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 14688	2462	2462	89%
<a href="#">NR_025002.1</a>	<i>Actinomadura vinacea</i> strain JCM 3325 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AF134070.1 AF134070 <i>Actinomadura vinacea</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2455	2455	87%
<a href="#">FJ849836.1</a>	<i>Actinomadura</i> sp. VAN305 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2446	2446	89%
<a href="#">AI293715.1</a>	<i>Actinomadura</i> sp. S2 partial 16S rRNA gene	2433	2433	90%
<a href="#">NR_025090.1</a>	<i>Actinomadura meyeræ</i> strain A288 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AY273787.1  <i>Actinomadura meyeræ</i> A288 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2427	2427	90%
<a href="#">HQ157187.1</a>	<i>Actinomadura</i> sp. A8036 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2425	2425	89%
<a href="#">AB364594.1</a>	<i>Actinomadura macra</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 14102	2425	2425	89%
<a href="#">AF223350.1</a>	Pseudonocardiaceae str. PA151 16S ribosomal RNA, complete sequence	2425	2425	89%
<a href="#">AB184612.2</a>	<i>Actinomadura glauciflava</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 14668	2423	2423	89%
<a href="#">EU741181.1</a>	<i>Actinomadura crenea</i> strain 13653A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2423	2423	89%
<a href="#">NR_025652.1</a>	<i>Actinomadura nitritigenes</i> strain L 46 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AY035999.1  <i>Actinomadura nitritigenes</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2423	2423	90%
<a href="#">AJ293706.1</a>	<i>Actinomadura livida</i> partial 16S rRNA gene, strain IMSNU 22191T	2423	2423	90%

## 10.4.12. Aislado P5

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage
<a href="#">EF654097.1</a>	<i>Streptomyces drozdowiczii</i> strain NRRL B-24297 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1230	1230	77%
<a href="#">AB249957.1</a>	<i>Streptomyces drozdowiczii</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 101007	1230	1230	77%
<a href="#">DQ167410.1</a>	<i>Streptomyces</i> sp. WL-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1230	1230	77%
<a href="#">EU841616.1</a>	<i>Streptomyces drozdowiczii</i> strain HBUM174905 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1223	1223	76%
<a href="#">EU808199.1</a>	<i>Streptomyces</i> sp. MS218 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1214	1214	77%
<a href="#">AM921646.1</a>	<i>Streptomyces drozdowiczii</i> partial 16S rRNA gene, isolate PhyCEm-1349	1208	1208	77%
<a href="#">AY996829.1</a>	<i>Streptomyces</i> sp. 80134 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1208	1208	77%
<a href="#">AM921645.1</a>	<i>Streptomyces drozdowiczii</i> partial 16S rRNA gene, isolate PhyCEm-1258	1205	1205	77%
<a href="#">HQ267972.1</a>	Uncultured <i>Streptomyces</i> sp. clone JL-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1203	1203	76%
<a href="#">AY754718.1</a>	<i>Streptomyces</i> sp. N0112 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1197	1197	77%
<a href="#">AY754717.1</a>	<i>Streptomyces</i> sp. N0111 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1197	1197	77%
<a href="#">HQ611065.1</a>	<i>Streptomyces</i> sp. zc-10-18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1195	1195	77%
<a href="#">FR837628.1</a>	<i>Streptomyces beijiagensis</i> partial 16S rRNA gene, isolate 5-4-1, clone psychro1	1192	1192	77%

10.4.13. *S. griseus*

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage
<a href="#">DQ086239.1</a>	Streptomyces sp. AB453 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2385	2385	91%
<a href="#">DQ086243.1</a>	Streptomyces sp. AB661 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">2381</a>	2381	91%
<a href="#">EU741123.1</a>	Streptomyces sp. 13636L 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">2377</a>	2377	91%
<a href="#">EU741122.1</a>	Streptomyces sp. 13636K 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2377	2377	91%
<a href="#">EU741151.1</a>	Streptomyces sp. 13648B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">2374</a>	2374	91%
<a href="#">EU741149.1</a>	Streptomyces sp. 13647S 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">2374</a>	2374	91%
<a href="#">DQ086246.1</a>	Streptomyces sp. I2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2374	2374	91%
<a href="#">DQ086245.1</a>	Streptomyces sp. I1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">2372</a>	2372	92%
<a href="#">DQ086247.1</a>	Streptomyces sp. I3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">2370</a>	2370	92%
<a href="#">EF142856.1</a>	Streptomyces albidoflavus strain JP 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">2359</a>	2359	91%

10.4.14. *S. yatusensis*

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage
<a href="#">AB249962.2</a>	Streptomyces yatusensis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 101000	<a href="#">1618</a>	1618	90%
<a href="#">AB373977.1</a>	Streptomyces sp. KS26 gene for 16S ribosomal RNA	1613	1613	90%
<a href="#">AB373976.1</a>	Streptomyces sp. KS24 gene for 16S ribosomal RNA	1613	1613	90%
<a href="#">AB373962.1</a>	Streptomyces sp. KS04 gene for 16S ribosomal RNA	1613	1613	90%
<a href="#">AB373961.1</a>	Streptomyces sp. KS02 gene for 16S ribosomal RNA	1613	1613	90%
<a href="#">EF371443.1</a>	Streptomyces hygroscopicus strain N41-24-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1613	1613	90%
<a href="#">AB249934.1</a>	Streptomyces sporoclivatus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 100767	1613	1613	90%
<a href="#">AB184723.1</a>	Streptomyces hygroscopicus subsp. crystallogenes gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 16551	1613	1613	90%
<a href="#">AB184185.1</a>	Streptomyces antimycoticus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 12839	1613	1613	90%
<a href="#">AJ781369.1</a>	Streptomyces sporoclivatus 16S rRNA gene, type strain LMG 20312	1609	1609	90%

## 10.5. Resultados del Ez Taxon para cada uno de los aislados

### 10.5.1 Tabla general de resultados

Query	Length (bp)	Closest match	Similarity (%)	Completeness (%)	Accession
S.yatensis	1,875	Streptomyces mordarskii NRRL B-1346(T)	98.10	100	EF408735
S.griseus	1,615	Streptomyces violascens ISP 5183(T)	98.78	100	AY999737
P5	1,818	Streptomyces drozdowiczii NBRC 101007(T)	94.43	100	AB249957
OAG-G1	1,497	Actinomadura viridis IFO 15238(T)	98.12	100	D85467
OAG-B1	1,572	Streptomyces cacaoi subsp. cacaoi NBRC 12748(T)	96.15	99.1	AB184115
HAR-18	1,617	Streptomyces cyaneofuscatus JCM 4364(T)	99.15	99.6	AY999770
HAR-17	2,025	Streptomyces pluricologescens NBRC 12808(T)	99.38	99.6	AB184162
F(12)	2,056	Streptomyces griseoplanus AS 4.1868(T)	98.42	99.5	AY999894
AK-1 (2)	2,095	Streptomyces carpaticus NBRC 15390(T)	98.41	99.7	AB184641
9(13) (2)	2,005	Streptomyces cyaneofuscatus JCM 4364(T)	99.08	99.5	AY999770
EMMA-6-12 (2)	2,008	Nonomuraea monospora PT708(T)	98.94	99.0	FJ347524
e(23)	1,897	Streptomyces griseoplanus AS 4.1868(T)	99.21	99.6	AY999894
AL-2	1,564	Streptomyces hainanensis YIM 47672(T)	99.44	98.8	AM398645
ae(4)	1,569	Streptomyces griseoplanus AS 4.1868(T)	98.97	99.3	AY999894

### 10.5.2. Aislado 9(13)

Rank	Name	Strain	Authors
1	Streptomyces cyaneofuscatus	JCM 4364(T)	(Kudrina 1957) Pridham et al. 1958
2	Streptomyces griseoplanus	AS 4.1868(T)	Backus et al. 1957
3	Streptomyces griseorubiginosus	NBRC 13047(T)	(Ryabova and Preobrazhenskaya 1957) I
4	Streptomyces halstedii	NBRC 12783(T)	(Waksman and Curtis 1916) Waksman a
5	Streptomyces microflavus	NBRC 13062(T)	(Krainsky 1914) Waksman and Henrici 1
6	Streptomyces griseolus	NBRC 3719(T)	(Waksman 1923) Waksman and Henrici
7	Streptomyces fulvoroebus	NBRC 15897(T)	Vinogradova and Preobrazhenskaya 198
8	Streptomyces cinereorectus	NBRC 15395(T)	Terekhova and Preobrazhenskaya 1986
9	Streptomyces griseus subsp. griseus	KCTC 9080(T)	(Krainsky 1914) Waksman and Henrici 1
10	Streptomyces rubiginosohevolus	NBRC 12912(T)	(Kudrina 1957) Pridham et al. 1958

## 10.5.3. Aislado ae(4)

Rank	Name	Strain	Authors
1	<i>Streptomyces griseoplanus</i>	AS 4.1868(T)	Backus et al. 1957
2	<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i>	JCM 4364(T)	(Kudrina 1957) Pridham et al. 1958
3	<i>Streptomyces cinereorectus</i>	NBRC 15395(T)	Terekhova and Preobrazhenskaya 1986
4	<i>Streptomyces setonii</i>	NBRC 13085(T)	(Millard and Burr 1926) Kim et al. (in pro
5	<i>Streptomyces pluricolorescens</i>	NBRC 12808(T)	Okami and Umezawa 1961
6	<i>Streptomyces rubiginosohevolus</i>	NBRC 12912(T)	(Kudrina 1957) Pridham et al. 1958
7	<i>Streptomyces microflavus</i>	NBRC 13062(T)	(Krainsky 1914) Waksman and Henrici 1
8	<i>Streptomyces fulvorobeus</i>	NBRC 15897(T)	Vinogradova and Preobrazhenskaya 198
9	<i>Streptomyces griseorubiginosus</i>	NBRC 13047(T)	(Ryabova and Preobrazhenskaya 1957) I
10	<i>Streptomyces anulatus</i>	NRRL B-2000(T)	(Beijerinck 1912) Waksman 1953

## 10.5.4. Aislado AK-1

Rank	Name	Strain	Authors
1	<i>Streptomyces carpaticus</i>	NBRC 15390(T)	Maksimova and Terekhova 1986
2	<i>Streptomyces cheonanensis</i>	VC-A46(T)	Kim et al. 2006
3	<i>Streptomyces hyderabadensis</i>	OU-40(T)	Reddy et al. 2011
4	<i>Streptomyces lacticiproducens</i>	GIMN4.001(T)	Zhu et al. 2011
5	<i>Streptomyces xiamenensis</i>	MCCC 1A01550(T)	Xu et al. 2009
6	<i>Streptomyces pactum</i>	NBRC 13433(T)	Bhuyan et al. 1962
7	<i>Streptomyces sodiiphilus</i>	YIM 80305(T)	Li et al. 2005
8	<i>Streptomyces radiopugnans</i>	R97(T)	Mao et al. 2007
9	<i>Streptomyces lomondensis</i>	NBRC 15426(T)	Johnson and Dietz 1969
10	<i>Streptomyces olivaceus</i>	NBRC 12805(T)	(Waksman 1923) Waksman and Henrici

## 10.5.5. Aislado AL-2

Rank	Name	Strain	Authors
1	<i>Streptomyces hainanensis</i>	YIM 47672(T)	Jiang et al. 2007
2	<i>Streptomyces mayteni</i>	YIM 60475(T)	Chen et al. 2009
3	<i>Streptomyces avicenniae</i>	MCCC 1A01535(T)	Xiao et al. 2009
4	<i>Streptomyces specialis</i>	GW 41-1564(T)	Kämpfer et al. 2008
5	<i>Streptomyces rapamycinicus</i>	NRRL B-5491(T)	Kumar and Goodfellow 2008
6	<i>Streptomyces sodiiphilus</i>	YIM 80305(T)	Li et al. 2005
7	<i>Streptomyces iranensis</i>	HM 35(T)	Hamedi et al. 2010
8	<i>Streptomyces cacaoi</i> subsp. <i>cacaoi</i>	NBRC 12748(T)	(Waksman 1932) Waksman and Henrici
9	<i>Streptomyces morookaense</i>	LMG 20074(T)	(Locci and Schofield 1989) Witt and Star
10	<i>Streptomyces aldersoniae</i>	NRRL 18513(T)	Kumar and Goodfellow 2010

## 10.5.6. Aislado e(23)

Rank	Name	Strain	Authors
1	<i>Streptomyces griseoplanus</i>	AS 4.1868(T)	Backus et al. 1957
2	<i>Streptomyces setonii</i>	NBRC 13085(T)	(Millard and Burr 1926) Kim et al. (in pr
3	<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i>	JCM 4364(T)	(Kudrina 1957) Pridham et al. 1958
4	<i>Streptomyces cinereorectus</i>	NBRC 15395(T)	Terekhova and Preobrazhenskaya 1986
5	<i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i>	NBRC 12912(T)	(Kudrina 1957) Pridham et al. 1958
6	<i>Streptomyces pluricolorscens</i>	NBRC 12808(T)	Okami and Umezawa 1961
7	<i>Streptomyces griseorubiginosus</i>	NBRC 13047(T)	(Ryabova and Preobrazhenskaya 1957) I
8	<i>Streptomyces fulvorobeus</i>	NBRC 15897(T)	Vinogradova and Preobrazhenskaya 198
9	<i>Streptomyces microflavus</i>	NBRC 13062(T)	(Krainsky 1914) Waksman and Henrici 1
10	<i>Streptomyces globisporus</i>	NBRC 12867(T)	(Krassilnikov 1941) Waksman 1953

## 10.5.7. Aislado Emma-6-12

Rank	Name	Strain	Authors
1	<i>Nonomuraea monospora</i>	PT708(T)	Nakaew et al. (in press)
2	<i>Nonomuraea rhizophila</i>	YIM 67092(T)	Zhao et al. 2011
3	<i>Nonomuraea dietziae</i>	DSM 44320(T)	Stackebrandt et al. 2001
4	<i>Nonomuraea recticatena</i>	IFO 14525(T)	(Terekhova et al. 1987) Zhang et al. 199
5	<i>Nonomuraea rosea</i>	GW 12687(T)	Kämpfer et al. 2010
6	<i>Nonomuraea roseola</i>	IFO 14685(T)	(Lavrova and Preobrazhenskaya 1975) Z
7	<i>Nonomuraea africana</i>	IFO 14745(T)	(Preobrazhenskaya and Sveshnikova 197
8	<i>Nonomuraea salmonea</i>	DSM 43678(T)	(Preobrazhenskaya et al. 1975) Zhang e
9	<i>Nonomuraea turkmeniaca</i>	DSM 43926(T)	(Terekhova et al. 1987) Zhang et al. 199
10	<i>Nonomuraea bangladeshensis</i>	5-10-10(T)	Ara et al. 2007

## 10.5.8. Aislado f(12)

Rank	Name	Strain	Authors
1	<i>Streptomyces griseoplanus</i>	AS 4.1868(T)	Backus et al. 1957
2	<i>Streptomyces globisporus</i>	NBRC 12867(T)	(Krassilnikov 1941) Waksman 1953
3	<i>Streptomyces pluricolorascens</i>	NBRC 12808(T)	Okami and Umezawa 1961
4	<i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i>	NBRC 12912(T)	(Kudrina 1957) Pridham et al. 1958
5	<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i>	JCM 4364(T)	(Kudrina 1957) Pridham et al. 1958
6	<i>Streptomyces badius</i>	NRRL B-2567(T)	(Kudrina 1957) Pridham et al. 1958
7	<i>Streptomyces parvus</i>	NBRC 3388(T)	(Krainsky 1914) Waksman and Henrici 1
8	<i>Streptomyces sindenensis</i>	NBRC 3399(T)	Nakazawa and Fujii 1957
9	<i>Streptomyces setonii</i>	NBRC 13085(T)	(Millard and Burr 1926) Kim et al. (in pr
10	<i>Streptomyces anulatus</i>	NRRL B-2000(T)	(Beijerinck 1912) Waksman 1953

## 10.5.9. Aislado HAR-17

Rank	Name	Strain	Authors
1	<i>Streptomyces pluricologrescens</i>	NBRC 12808(T)	Okami and Umezawa 1961
2	<i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i>	NBRC 12912(T)	(Kudrina 1957) Pridham et al. 1958
3	<i>Streptomyces setonii</i>	NBRC 13085(T)	(Millard and Burr 1926) Kim et al. (in pre
4	<i>Streptomyces griseoplanus</i>	AS 4.1868(T)	Backus et al. 1957
5	<i>Streptomyces sindenensis</i>	NBRC 3399(T)	Nakazawa and Fujii 1957
6	<i>Streptomyces parvus</i>	NBRC 3388(T)	(Krainsky 1914) Waksman and Henrici 1
7	<i>Streptomyces globisporus</i>	NBRC 12867(T)	(Krassilnikov 1941) Waksman 1953
8	<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i>	JCM 4364(T)	(Kudrina 1957) Pridham et al. 1958
9	<i>Streptomyces badius</i>	NRRL B-2567(T)	(Kudrina 1957) Pridham et al. 1958
10	<i>Streptomyces cinereorectus</i>	NBRC 15395(T)	Terekhova and Preobrazhenskaya 1986

## 10.5.10. Aislado HAR-18

Rank	Name	Strain	Authors
1	<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i>	JCM 4364(T)	(Kudrina 1957) Pridham et al. 1958
2	<i>Streptomyces pluricologrescens</i>	NBRC 12808(T)	Okami and Umezawa 1961
3	<i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i>	NBRC 12912(T)	(Kudrina 1957) Pridham et al. 1958
4	<i>Streptomyces parvus</i>	NBRC 3388(T)	(Krainsky 1914) Waksman and Henrici 1
5	<i>Streptomyces setonii</i>	NBRC 13085(T)	(Millard and Burr 1926) Kim et al. (in pre
6	<i>Streptomyces griseoplanus</i>	AS 4.1868(T)	Backus et al. 1957
7	<i>Streptomyces sindenensis</i>	NBRC 3399(T)	Nakazawa and Fujii 1957
8	<i>Streptomyces globisporus</i>	NBRC 12867(T)	(Krassilnikov 1941) Waksman 1953
9	<i>Streptomyces fulvorobeus</i>	NBRC 15897(T)	Vinogradova and Preobrazhenskaya 198
10	<i>Streptomyces griseorubiginosus</i>	NBRC 13047(T)	(Ryabova and Preobrazhenskaya 1957) l

## 10.5.11. Aislado OAG-B1

Rank	Name	Strain	Authors
1	<i>Streptomyces cacaoi</i> subsp. <i>cacaoi</i>	NBRC 12748(T)	(Waksman 1932) Waksman and Henrici
2	<i>Streptomyces hainanensis</i>	YIM 47672(T)	Jiang et al. 2007
3	<i>Streptomyces sodiiphilus</i>	YIM 80305(T)	Li et al. 2005
4	<i>Streptomyces rangoonensis</i>	LMG 20295(T)	(Erikson 1935) Pridham et al. 1958
5	<i>Streptomyces albus</i> subsp. <i>albus</i>	NRRL B-2365(T)	(Rossi Doria 1891) Waksman and Henrici
6	<i>Streptomyces gibsonii</i>	NBRC 15415(T)	(Erikson 1935) Waksman and Henrici 19
7	<i>Streptomyces almquistii</i>	NBRC 13015(T)	(Duche 1934) Pridham et al. 1958
8	<i>Streptomyces mayteni</i>	YIM 60475(T)	Chen et al. 2009
9	<i>Streptomyces thermoalcalitolerans</i>	NBRC 16322(T)	Kim et al. 1999
10	<i>Streptomyces panacagri</i>	Gsoil 519(T)	Cui et al. (in press)

## 10.5.12. Aislado OAG-G1

Rank	Name	Strain	Authors
1	<i>Actinomadura viridis</i>	IFO 15238(T)	(Nonomura and Ohara 1971) Miyadoh et
2	<i>Actinomadura vinacea</i>	JCM 3325(T)	Lavrova and Preobrazhenskaya 1975
3	<i>Actinomadura rugatobispora</i>	IFO 14382(T)	Miyadoh et al. 1991
4	<i>Actinomadura livida</i>	JCM 3387(T)	Lavrova and Preobrazhenskaya 1975
5	<i>Actinomadura madurae</i>	DSM 43067(T)	(Vincent 1894) Lechevalier and Lecheval
6	<i>Actinomadura yumaensis</i>	JCM 3369(T)	Labeda et al. 1985
7	<i>Actinomadura coerulea</i>	IFO 14679(T)	Preobrazhenskaya et al. 1975
8	<i>Actinomadura fibrosa</i>	ATCC 49459(T)	Mertz and Yao 1990
9	<i>Actinomadura verrucosospora</i>	NBRC 14100(T)	Nonomura and Ohara 1971
10	<i>Actinomadura mexicana</i>	A290(T)	Quintana et al. 2004

## 10.5.13. Aislado P5

Rank	Name	Strain	Authors
1	<i>Streptomyces drozdowiczii</i>	NBRC 101007(T)	Semêdo et al. 2004
2	<i>Streptomyces brevispora</i>	BK160(T)	Zucchi et al. 2012
3	<i>Streptomyces beijiangensis</i>	NBRC 100044(T)	Li et al. 2002
4	<i>Streptomyces laculatispora</i>	BK166(T)	Zucchi et al. 2012
5	<i>Streptomyces setonii</i>	NBRC 13085(T)	(Millard and Burr 1926) Kim et al. (in pre
6	<i>Streptomyces pluricolorescens</i>	NBRC 12808(T)	Okami and Umezawa 1961
7	<i>Streptomyces sannanensis</i>	NBRC 14239(T)	Iwasaki et al. 1981
8	<i>Streptomyces sanglieri</i>	NBRC 100784(T)	Manfio et al. 2003
9	<i>Streptomyces parvus</i>	NBRC 3388(T)	(Krainsky 1914) Waksman and Henrici 1
10	<i>Streptomyces zaomyceticus</i>	NBRC 13348(T)	Hinuma 1954

10.5.14. *S. griseus*

Rank	Name	Strain	Authors
1	<i>Streptomyces violascens</i>	ISP 5183(T)	(Preobrazhenskaya and Sveshnikova 195
2	<i>Streptomyces albidoflavus</i>	DSM 40455(T)	(Rossi Doria 1891) Waksman and Henric
3	<i>Streptomyces somaliensis</i>	NBRC 12916(T)	(Brumpt 1906) Waksman and Henrici 19
4	<i>Streptomyces hydrogenans</i>	NBRC 13475(T)	Lindner et al. 1958
5	<i>Streptomyces daghestanicus</i>	NRRL B-5418(T)	(Sveshnikova 1957) Pridham et al. 1958
6	<i>Streptomyces luteogriseus</i>	NBRC 13402(T)	Schmitz et al. 1964
7	<i>Streptomyces deserti</i> (Invalid name)	C63(T)	Santhanam et al. 2011
8	<i>Streptomyces koyangensis</i>	VK-A60(T)	Lee et al. 2005
9	<i>Streptomyces levis</i>	NBRC 15423(T)	Sveshnikova 1986
10	<i>Streptomyces phaeoluteichromatogenes</i>	NRRL 5799(T)	Goodfellow et al. 2008

10.5.15. *S. yatensis*

Rank	Name	Strain	Authors
1	<i>Streptomyces mordarskii</i>	NRRL B-1346(T)	Kumar and Goodfellow 2008
2	<i>Streptomyces geldanamycininus</i>	NRRL B-3602(T)	Goodfellow et al. 2008
3	<i>Streptomyces yatensis</i>	NBRC 101000(T)	Saintpierre et al. 2003
4	<i>Streptomyces antimycoticus</i>	NBRC 12839(T)	Waksman 1957
5	<i>Streptomyces melanosporofaciens</i>	NBRC 13061(T)	Arcamone et al. 1959
6	<i>Streptomyces sporodivatus</i>	NBRC 100767(T)	(ex Krasil'nikov 1970) Preobrazhenskaya
7	<i>Streptomyces castelarensis</i>	DSM 40830(T)	(Cercos 1954) Kumar and Goodfellow 2008
8	<i>Streptomyces indonesiensis</i>	DSM 41759(T)	Sembiring et al. 2001
9	<i>Streptomyces cangkringensis</i>	D13P3(T)	Sembiring et al. 2001
10	<i>Streptomyces samsunensis</i>	M1463(T)	Sazak et al. 2011