

Mtra. María Elena Contreras Garfias
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
PRESENTE

Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
					27	01	2022

Datos del Alumno

Nombre : Yadira Ivette Rodríguez Saldaña	
Matrícula : 2123056513	Licenciatura : Química Farmacéutica Biológica
Domicilio : Cazones, # 1, Col. San Jerónimo Aculco, CP. 10400, Magdalena Contreras, CDMX	
Teléfono : 5556832195	Celular : 5561630182
Correo Electrónico : iday_rosy@hotmail.com	CURP : ROSY901121MDFDLD09

Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto : Descripción morfológica, metabólica y genética de la colección 4000 de actinomicetos del Laboratorio de Producción de Biológicos							
Lugar donde se realizó el Servicio Social : Laboratorio 202 Producción de Biológicos, Edif. N							
Dependencia : UAM-Xochimilco							
Entidad Federativa : Distrito Federal							
Municipio : Coyoacán				Localidad : Coyoacán			
Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año
	20	5	2019		23	12	2019

PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector: 1.- Educativo	Tipo: 2.- Interno
Orientación: 10.- Otros	

FIRMAS

Q.F.B. Nora Lidia Sánchez Saucedo
Asesor Interno
Nombre, firma y No. Económico

M. en C. Janette B. González Nava
Asesor Externo *Céd. 8870638*
Nombre, firma y No. Económico

Yadira Ivette Rodríguez Saldaña
Alumno
Nombre, firma

Dra. Norma Angélica Noguez Méndez
Vo. Bo. de la Comisión
Nombre y firma de la persona que autoriza



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

México, D.F. a 19 de mayo del 2021.

Dr. Juan Esteban Barranco Florido
Jefe del Departamento de Sistemas Biológicos
Presente.

Por medio de la presente me permito comunicar a usted que la alumna Yadira Ivette Rodríguez Saldaña con matrícula 2123056513 concluyó el proyecto de servicio social “Descripción morfológica, metabólica y genética de la colección 4000 de actinobacterias del laboratorio de Producción de Biológicos”, que realizó en el laboratorio 202 de Producción de Biológicos ubicado en la UAM-Xochimilco del 20 de mayo del 2019 al 23 de diciembre del 2019 bajo mi asesoría.

Cubriendo un total de 480 horas.

ATENTAMENTE

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Janette B. González Nava', written over a horizontal line.

M. en C. Janette Berenice González Nava
Céd. 8870638

c.c.p. Mtra. María Elena Contreras Garfias



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

Ciudad de México, a 1° de junio del año 2021

Dr. Esteban Barranco Florido
Jefe del Departamento de Sistemas Biológicos
Presente

Por medio de la presente me permito comunicar a Usted que la alumna **Yadira Ivette Rodríguez Saldaña** con matrícula **2123056513** concluyó el proyecto de servicio social "**Descripción morfológica, metabólica y genética de la colección 4000 de actinobacterias del laboratorio de Producción de Biológicos**", que realizó en el laboratorio 202 de Producción de Biológicos ubicado en la UAM-Xochimilco del 20 de mayo del 2019 al 23 de diciembre del 2019 bajo mi asesoría.

Cubriendo un total de 480 horas.

ATENTAMENTE

Q.F.B. Nora Lidia Sánchez Saucedo
No. Ec. 18752
Departamento de Sistemas Biológicos



**DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA, METABÓLICA Y GENÉTICA DE LA
COLECCIÓN 4000 DE ACTINOBACTERIAS DEL LABORATORIO DE
PRODUCCIÓN DE BIOLÓGICOS**

REPORTE DE SERVICIO SOCIAL

PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

PRESENTA

YADIRA IVETTE RODRIGUEZ SALDAÑA

ASESORES

Interno: Q.F.B. NORA LIDIA SÁNCHEZ SAUCEDO

Externo: M. EN C. JANETTE B. GONZÁLEZ NAVA


Nº Ec. 18752

Fecha de inicio: 20 de mayo del 2019

Fecha de término: 23 de diciembre del 2019


M.enC. Janette B. González Nava
19-Mayo-2021

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Actinomicetos	2
3. Nocardia	6
4. Taxonomía	10
5.1 General.....	11
5.2 Específicos.....	11
6. Justificación.....	11
7. Metodología	12
7.1 Descripción morfológica.....	12
7.2 Pruebas fenotípicas.....	12
7.3 Pruebas bioquímicas automatizadas API	14
7.4 Prueba de sensibilidad a antibióticos	20
7.5 Análisis fenotípico.....	20
7.6 Prueba Genética	21
8. Resultados	24
9. Discusión	34
10. Anexos.....	36
11. Referencias.....	37

1. Introducción

Dentro de la gran variedad de microorganismos habitantes del suelo se encuentran los actinomicetos; bacterias que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, la mayoría de estas bacterias se encuentran en la tierra jugando un papel importante en la descomposición de la materia orgánica. Su hábitat más común es el suelo, aunque otras actinobacterias habitan en plantas, animales y personas, ya sea como agentes benéficos o patógenos.

El metabolismo de los actinomicetos juega un papel importante en el mantenimiento del ambiente en el que se desarrollan por la producción de metabolitos secundarios por ejemplo la geosmina metabolito secundario que su olor característico es de “tierra húmeda” que es sintetizado por especies de *Streptomyces*. (Evangelista *et al.*, 2017).

No todos los géneros de actinomicetos son benéficos existen algunos que son patógenos tanto para animales como para el hombre como los géneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Tsukamurella* y *Actinomadura*.

Cuando interactúan estas bacterias con el humano provocan una infección llamada actinomicetoma. Las infecciones producidas por actinomicetos patógenos, se considera un problema de salud pública, principalmente en países subdesarrollados y no han sido estudiados a profundidad, esto se debe a las limitaciones con las que cuentan los laboratorios clínicos (Serrano *et al*, 2005).

Para la correcta identificación a nivel de especie se utilizan técnicas de biología molecular como la amplificación del gen 16S rRNA. Para conocer el comportamiento de las bacterias en su entorno se pueden realizar pruebas bioquímicas. La información que nos brindan los resultados de pruebas moleculares y bioquímicas nos permiten conocer mejor a las bacterias patógenas, y así, dar un diagnóstico oportuno y un tratamiento eficaz contra estas bacterias patógenas evitando el uso irracional de antibióticos (González, 2016).

2. Actinomicetos

Los actinomicetos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza donde su hábitat más común es el suelo, ejercen un papel ecológico importante en la degradación de materia orgánica, además de las propiedades fisiológicas que los hacen particulares (Evangelista *et al.*, 2017).

Son bacterias Gram positivas, aeróbicas que constituyen entre el 20 y 60 % de la población de microorganismos en el suelo. Anteriormente se les consideraba como hongos, puesto que comparten muchas similitudes con ellos, una de ellas es la formación de un micelio filamentososo ramificado. (Franco, 2008 y Parada *et al.*, 2017).

La diferencia entre los actinomicetos y los hongos se deben a las siguientes propiedades:

- 1) Los actinomicetos son células procariotas.
- 2) Sus filamentos tienen un diámetro de 1 μm o menor, más pequeño que el de las hifas típicas de los hongos.
- 3) Los filamentos de los actinomicetos son más delgados y se fragmentan en formas cocobacilares.
- 4) La pared celular de los actinomicetos contiene peptidoglicano.
- 5) Alto contenido de guanina y citosina en su ADN.
- 6) Son sensibles a la penicilina, tetraciclina, sulfamidas y a otros fármacos antibacterianos que son inactivos frente a los hongos. (Franco, 2008)

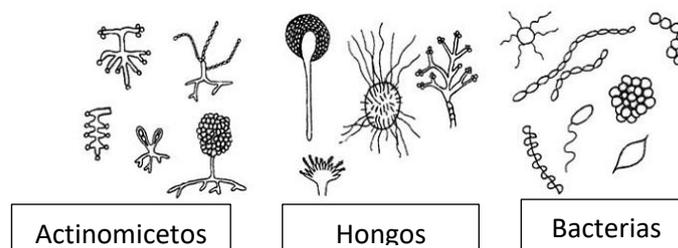


Figura 1. Formas celulares de microorganismos (Rink, 1992)

En la siguiente tabla se muestran las diferencias que tienen algunos géneros de actinomicetos, de acuerdo a sus características morfológicas.

Tabla 1. Características morfológicas de los géneros *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Streptomyces* (González, 2013)

Género	Características Morfológicas
<i>Nocardia</i>	<p style="text-align: center;">Aerobias</p> <p>Colonias: irregulares, lisas, duras, hacinadas, de aspecto ceroso o secas.</p> <p>Color: blanco hasta naranja, rojo, marrón o asalmonado.</p> <p>Aspecto microscópico: filamentos aéreos, fragmentación dando lugar a células cocobacilares.</p> <p>Olor: enmohecido o tierra mojada.</p>
<i>Rhodococcus</i>	<p style="text-align: center;">Aerobias</p> <p>Colonias: tipo mucoide, lisas o rugosas</p> <p>Color: coral, crema, rojo o anaranjado</p> <p>Aspecto microscópico: cocoides, bacilares o cocobacilares (dependiendo el tipo de muestra o tiempo de cultivo)</p>
<i>Streptomyces</i>	<p style="text-align: center;">Aerobias</p> <p>Colonias: cerosas, aspecto polvoso</p> <p>Color: blanco grisáceo, crema a negro. dependiendo las condiciones de cultivo</p> <p>Aspecto microscópico: Filamentos ramificados (hifas) aéreos</p>

El metabolismo de los actinomicetos juega un papel importante para el mantenimiento del ambiente en el que se desarrollan por la producción de

metabolitos secundarios. Presentan un olor característico a “tierra húmeda” que es producido por un metabolito secundario llamado geosmina, que es sintetizado por especies de *Streptomyces* (Evangelista *et al.*, 2017).

Tienen un papel importante en los ecosistemas, degradan la materia orgánica y participan en el ciclo biogeoquímico de muchos nutrientes. En el suelo están presentes como saprófitos, comensales y simbioses. El género *Frankia* crece en simbiosis ayuda a las raíces de las plantas fijando el nitrógeno atmosférico para el beneficio de la planta (Reyes *et al.*, 2015).

A lo largo del tiempo los actinomicetos han sido estudiados por la importancia que éstos desempeñan en diferentes ámbitos, es decir las aplicaciones que tienen en la agricultura, medicina y veterinaria. Algunas de las que más destacan son la producción de antibióticos y como promotores del desarrollo de las plantas (González, 2010).

Los actinomicetos pertenecientes al orden *Actinomycetales* son los responsables en la producción de metabolitos con el género *Streptomyces* en primer lugar seguido de las especies de los géneros *Micronospora*, *Actinomadura*, *Streptoverticillium*, *Actinoplanes*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora* y *Streptosporangium* (Evangelista *et al.*, 2017).

Parada *et al* (2017) menciona que las cepas del género *Streptomyces*, son las principales productoras de la mayoría de los antibióticos de uso humano y animal, por ejemplo, la estreptomycin, vancomicina y rifampicina.

La agricultura para el control de plagas emplea químicos que con su uso constante resultan tóxicos tanto para el suelo, plantas y para el ser humano (Reyes *et al.*, 2015). Actualmente se están buscando otras alternativas amigables con el medio ambiente, entre ellas están el uso de microorganismos como control biológico en agricultura.

El papel de los actinomicetos en el desarrollo de las plantas es importante, ayudan en el crecimiento y fijación de nutrientes, también a que las plantas no tengan

presencia de patógenos durante su desarrollo, es decir funcionan como fitoprotectores (González, 2010).

No todos los géneros de actinomicetos son benéficos, existen algunos que son patógenos tanto para animales como para el hombre. Entre los que destacan como patógenos son los corineformes y nocardioformes, que incluyen los géneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Tsukamurella* y *Actinomadura* (Serrano *et al*, 2005).

Se cree que la presencia de este tipo de microorganismos patógenos se asocia con países tercermundistas, con clima tropical y subtropical, pero se han encontrado en países de primer mundo como Estados Unidos. El número de casos de infecciones producidas por actinomicetos patógenos está creciendo en países latinoamericanos, se pueden considerar problemas de salud pública (Serrano *et al*, 2005).

El primer actinomiceto reconocido como patógeno fue aislado por Edmund Nocard en 1888 en una infección de bovino. El primer caso de nocardiosis en humanos, lo fue descubierto por Eppinger en 1891 en un paciente con “síndrome pseudotuberculoso” y abscesos cerebrales por un microorganismo que aisló Nocard (González, 2006).

Cuando hay interacción con el humano recibe el nombre de actinomicetoma, una infección granulomatosa que afecta la piel, tejido subcutáneo y algunas veces músculos y huesos, llegando a causar deformaciones de las partes afectadas (Serrano *et al*, 2007)



Figura 2 Actinomicetoma de 5 años de evolución que afecta pierna y muslo (Méndez, s.f.)

3. Nocardia

EL género *Nocardia*, fue descrito por primera vez por Trevisan en 1889(González, 2006). Este género se compone de un grupo diverso de microorganismos aeróbicos que no han sido del todo descritos. Son Gram positivas, poco ácido-resistentes y no ácido-resistentes, sus filamentos ramificados cuando se fragmentan varían de formas cocoides o bacilares (Serrano *et al*, 2005).

Este género se compone por 214 especies, y la mayoría de las especies son reconocidas como patógenas de humanos y animales. Las especies que son de interés médico son: *N. asteroides*, *N. brasiliensis* y *N. otitidiscavarium*. (González, 2006 y LPSN- List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature).

La nocardiosis es una enfermedad causada generalmente por *N. asteroides*, ésta ocasiona una infección pulmonar, que se disemina a través del torrente sanguíneo y linfático a otras partes del cuerpo. Aunque también puede iniciar en el sistema nervioso central, afectando riñones, ojos u otros órganos. El actinomicetoma es causado generalmente por *N. brasiliensis* y esta provoca infecciones crónicas granulomatosas y algo característico es la formación de granos que salen por las fístulas de la lesión (Serrano *et al*, 2005).

Existen otros factores que se asocian a este tipo de infecciones causadas por *Nocardia* y son: éstos patógenos ingresan al cuerpo de los trabajadores que transportan plantas, el constante contacto directo con la tierra sin ninguna protección y al tocar objetos (punzocortantes) contaminados. Las personas inmunodeprimidas son las más afectadas (Uzcategui, 2009).

Los métodos habituales a nivel clínico para su identificación son: un examen microscópico, para la determinación de su morfología utilizando técnicas como tinción de Gram, y ácido resistencia por Zhiel Neelsen o Kinyoun, además de pruebas adicionales como la hidrólisis de xantina, hipoxantina, tirosina y caseína, descomposición de urea y resistencia a la lisozima, es decir son las pruebas convencionales para la identificación de *Nocardia* (Serrano *et al*, 2007).

Serrano *et al* (2005) destacan la importancia de estudiar la sensibilidad a los antibióticos por *Nocardia* para obtener un diagnóstico oportuno y dar un tratamiento eficaz, así evitar infecciones crónicas y degenerativas.

Estos son algunos ejemplos de actinomicetos patógenos causados por *Nocardia* en clínica.

Tabla 2. Actinomicetos patógenos (Serrano *et al*, 2005)

ACTINOMICETOS PATÓGENOS ENCONTRADOS EN ESPECÍMENES CLÍNICOS		
Organismos	Ocurrencia en el hombre	Enfermedad producida
<i>N. asteroides</i>	Generalmente patógeno	Nocardiosis, ocasional actinomicetoma
<i>N. brasiliensis</i>	Generalmente patógeno	Actinomicetoma, ocasional nocardiosis
<i>N. otitidiscavarium</i>	Generalmente patógeno	Nocardiosis y actinomicetoma
<i>N. farcinica</i>	Raro (generalmente animales)	Nocardiosis

No todas las especies de *Nocardia* son fáciles de determinar con pruebas convencionales por ejemplo *N. carnea*, *N. transvaliensis* y *N. otitidiscavarium* y la mayoría de las veces se diagnostican como *N. asteroides*. Las que si son separables a nivel clínico son *N. asteroides* y *N. brasiliensis*, utilizando pruebas bioquímicas convencionales (Serrano *et al*, 2007).

Las pruebas tradicionales son de gran importancia, se utilizan para ver qué compuestos producen estos y las diferentes aplicaciones biotecnológicas que pueden tener en la medicina, la industria alimentaria (saborizantes), productos farmacéuticos, etc. (Sánchez *et al*, 2017).

El realizar suficientes pruebas bioquímicas nos sirve para conocer su metabolismo, sus características fenotípicas. Conociendo su catabolismo podemos utilizarlo para beneficio ya sea en la degradación de compuestos tóxicos, enzimas, azúcares simples, proteínas, etc. Y las diferentes aplicaciones biotecnológicas que tienen en diferentes ámbitos como la medicina y la industria (Fernández *et al*, 2010).

El uso de pruebas automatizadas como API (Analytical Profile Index) 20 NE y 20 E nos indica si está presente una enzima o sustrato en el actinomiceto, por ejemplo en la prueba de URE (Urea) si la bacteria puede degradar urea en un ambiente anaerobio, NO₃ (Nitrato de potasio) si contiene la enzima nitrato reductasa para la reducción de nitratos a nitritos, GLU (Glucosa) si tiene la glucosa y si la asimila o fermenta (anaerobia). Y así poder aprovechar lo que utilizan y darle diferentes aplicaciones (Serrano *et al*, 2007)

Ramírez *et al* (2006) mencionan algunas de las aplicaciones de las enzimas que producen los actinomicetos halófilos, con un gran potencial biotecnológico.

Tabla 3. Enzimas y otras moléculas de microorganismos halófilos y sus aplicaciones biotecnológicas (Ramírez *et al*, 2006)

	Fuente	Aplicación
Microorganismos Halófilos	Nucleasas, amilasas	Agentes saborizantes
	β-caroteno, ácido linoléico y extractos celulares (Spirulina y Dunaleilla)	Alimentos naturales, complementos alimenticios, colorantes para alimentos y alimento para ganado
	Polihidroxicanoatos	Plásticos de uso en medicina
	Lípidos	Liposomas para la liberación de fármacos y cosméticos
	Glicerol	Productos farmacéuticos

Existen similitudes entre las especies de *Nocardia*, por lo tanto, su identificación es difícil con las pruebas bioquímicas convencionales y se tienen que utilizar otras técnicas que faciliten la identificación de nuevas cepas y hacer revisión de las ya existentes. Estas técnicas no son convencionales en clínica, por ejemplo la biología

molecular que consiste en el conocimiento del genoma, PCR-RFLP (Reacción en Cadena de Polimerasa - Polimorfismo de Largo de Fragmento de Restricción), 16S ARNr, hibridación ADN: ADN y estudios quimiotaxonómicos (Paillié, 2011).

Las técnicas moleculares para el análisis de los genomas de los actinomicetos, y en general de las bacterias, ha sido un gran aporte para facilitar su clasificación taxonómica (Koneman, 2008).

Las subunidades 16S ARNr y la 23S ARNr son moléculas con la suficiente información para hacer comparaciones significativas. La 16S ARNr es la más utilizada para análisis filogenéticos. Paillié (2011) menciona que los genes que codifican para la unidad 16S ARNr, contienen regiones conservadas y regiones muy variables, que hacen posible la medida de las relaciones filogenéticas entre taxones cercanos o distantes (Dominio, reino, filo, clase, orden, familia, género y especie en bacterias).

El gen que codifica a la subunidad 16S ARNr es el gen *rrs*, aunque se tiene una desventaja al emplear este gen para analizar cepas del género *Nocardia*, debido a su escaso polimorfismo (dos o más variantes) es complicado diferenciar las cepas hasta nivel de algunas especies. Por lo tanto, el combinar diferentes genes permite poder realizar un análisis filogenético correcto y obtener una base molecular para identificar de manera más precisa hasta nivel de especie. Por ejemplo, el gen *sodA* que codifica la enzima superóxido dismutasa se ha empleado con éxito para la identificación de actinomicetos (Sánchez *et al*, 2017).

El uso de técnicas moleculares y el empleo de estudios taxonómicos han facilitado el estudio y correcta identificación de los actinomicetos, el inconveniente es que los laboratorios clínicos convencionales no cuentan con ellos de manera rutinaria además del costo alto que tienen. Esto da origen a una búsqueda de nuevas técnicas para su diagnóstico, que determinen en forma rápida y eficiente los actinomicetos y que son de gran interés en investigación de estos microorganismos (Serrano *et al*, 2005).

4. Taxonomía

Sandoval *et al* (1993) llevaron a cabo estudios que sirvieron para explicar y comprender mejor el problema de clasificación de actinomicetos puesto que tienen similitudes y así facilitar los estudios de patogenicidad, sensibilidad a antibióticos, problemas epidemiológicos, etc. Con base en trabajos realizados donde encontraron especies nuevas que fueron aceptados y se encuentran disponibles en el Manual de Bergey's.

El género *Nocardia* ha sufrido grandes cambios taxonómicos, esto se debe a que los estudios de biología molecular han demostrado la heterogeneidad entre especies. Por eso es difícil su identificación con los métodos convencionales, algunos ejemplos del género *Nocardia* que son difíciles de diferenciar son: *N. nova*, *N. farcinica*, *N. abscesus* y *N. cyriacigeorgica*. Y se deben de establecer criterios diferentes para su clasificación, como pruebas de asimilación de sustratos, pruebas enzimáticas y sensibilidad a antibióticos para la correcta identificación (Uzcategui, 2009).

Los métodos de clasificación basados en la filogenia nos indican las relaciones evolutivas entre las especies, cuales descienden de ancestros comunes y cuál es la distancia entre ellas. Estos métodos filogenéticos nos permiten reconstruir el árbol que representa la historia evolutiva entre las especies, partiendo de las evidencias de las que se dispongan. Los datos morfológicos, bioquímicos y genotípicos, son algunas evidencias que se pueden utilizar para la reconstrucción de árboles filogenéticos (Filogenias, s.f.).

Las metodologías utilizadas en la filogenética como los árboles (UPGMA, Unweithed Pair Group Method with Arithmetic Mean, basados en algoritmos) también se pueden utilizar en taxonomía. En este caso no se está reconstruyendo una historia evolutiva, sino que se hacen las relaciones de similitud entre los distintos grupos o individuos clasificados (Filogenias, s.f.).

5. Objetivos

5.1 General:

Describir la morfología, el metabolismo y genética de una colección de 20 cepas de actinobacterias del cepario del LPB (Laboratorio de Producción de Biológicos).

5.2 Específicos:

- Describir la morfología macroscópica y microscópica de cepas de actinomicetos del cepario del LPB.
- Caracterizar fenotípicamente a los actinomicetos mediante pruebas bioquímicas.
- Identificar género y especie aplicando técnicas moleculares mediante la secuenciación del gen 16S rRNA.

6. Justificación

Los actinomicetos son de gran interés de estudio por el potencial que tienen en diferentes ámbitos como la agricultura (procesos de biorremediación), medicina (producción de antibióticos), producción de alimentos, enzimas de interés industrial, entre otros. Es importante conocer sus características y metabolismo, realizando pruebas bioquímicas para sacar su máximo provecho.

Por otra parte, las infecciones ocasionadas por actinomicetos patógenos están creciendo y se considera un problema de salud pública, pues la identificación es difícil debido a las limitaciones con las que cuentan los laboratorios clínicos. Las pruebas convencionales no son suficientes para una identificación correcta de las especies de actinomicetos, se deben complementar con otro tipo de pruebas como las técnicas moleculares, la desventaja es que no están dentro de la rutina de pruebas en los laboratorios clínicos debido a su alto costo.

La realización del estudio de las cepas de actinomicetos empleando las diferentes técnicas (convencionales y no convencionales) para identificarlas hasta nivel de especie, puede contribuir al diagnóstico preciso y al tratamiento oportuno del actinomicetoma, evitando que la gente haga uso irracional de los antibióticos. Así

como apoyo en futuros estudios sobre la degradación o producción de diferentes compuestos.

7. Metodología

La investigación se realizó con el estudio de 20 cepas de actinomicetos provenientes del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) aislados de casos clínicos y con una antigüedad de 60 años que forman parte del cepario del LPB de la UAM-X.

7.1 Descripción morfológica

Las cepas se sembraron para su reactivación en cajas Petri por estría cruzada para la obtención de cepas puras, en medio de cultivo agar dextrosa Sabouraud (ADS), (Bioxon 214700) con papa deshidratada al 1%, a 37 ° C en incubación hasta su crecimiento (4-30 días).

Morfología macroscópica: Una vez que las cepas crecieron con la cantidad suficiente de biomasa, se observaron las características de las colonias como la forma, textura, tamaño y color.

Morfología microscópica: Se realizó la tinción de Gram para observar sus células (filamentos, hifas, ramificación y fragmentación en formas cocobacilares) en un microscopio Leika mod. 1349521X.

7.2 Pruebas fenotípicas

Se realizaron pruebas bioquímicas tradicionales para observar la degradación de sustratos, de acuerdo a las características fisiológicas de las cepas estudiadas.

Caseína

Se prepararon dos soluciones por separado:

- Solución A: Se utilizó el medio "Skim Milk" en polvo (10 g /100 mL) con agua destilada.
- Solución B: Se utilizó agar nutritivo (15 g/1000 mL) con agua destilada.
- Ambas soluciones se esterilizaron por separado en autoclave a 121 °C durante 10 minutos.

- Se mezclaron las dos soluciones homogéneamente y se vaciaron en cajas Petri y se dejó enfriar.
- Se sembraron las cepas en el centro de la placa, cada una por separado.
- Se incubaron a 37 ° C hasta el crecimiento de la colonia y se observó formación de un halo alrededor de ella, eso quiere decir que la cepa contiene las enzimas para degradar la caseína y la prueba es positiva.

Tirosina

Se prepararon dos soluciones por separado:

- Solución A: Se empleó tirosina (2.5 g / 50 mL) con agua destilada.
- Solución B: Se utilizó agar nutritivo (11.5 g /500 mL).
- Las dos soluciones se esterilizan por separado en autoclave a 121 °C durante 10 min.
- Se mezclaron las dos soluciones homogéneamente, se vaciaron en cajas Petri y se dejó enfriar.
- Se sembraron las cepas en el centro de la placa, cada una por separado.
- Se incubaron a 37 ° C hasta el crecimiento de la colonia y se observó la formación de un halo alrededor de ella, eso quiere decir que la cepa tiene las enzimas para utilizar la tirosina en su metabolismo y la prueba es positiva.

Lisozima

Se prepararon dos soluciones por separado:

- Solución A: Se preparó caldo glicerol (peptona 1.0 g, glicerol 70 g) con agua destilada (1 L).
- Solución B: Se preparó la lisozima (100 g) en HCL 0.01N (100 mL).
- La solución A se esterilizó en autoclave a 121 ° C durante 10 minutos y la Solución B se esterilizó por filtración.
- Se mezclaron las dos soluciones y se colocaron 10 mL de la solución en tubos de ensayo con tapa de rosca.

- La inoculación se hizo colocando en el tubo la cantidad suficiente de la colonia, se utilizó un tubo sin inóculo como control.
- Posteriormente se incubaron los tubos a 37° C durante 2-3 días.
- Si las cepas tienen las enzimas para degradar la lisozima y la capacidad para su crecimiento el resultado es positivo.

Urea

- Se preparó caldo urea (3.87 g /100 mL) con agua destilada.
- Luego se esterilizó en la autoclave 108° C durante 10 minutos.
- Se agregó en tubos de ensayo con tapa rosca 10 mL de caldo de urea.
- La inoculación se hizo colocando en el tubo la cantidad suficiente de la colonia, se utilizó un tubo sin inóculo como control.
- Los tubos se incubaron a 37° C durante 2-3 días.
- Si las cepas tienen las enzimas para utilizar la urea en su metabolismo, al ser descompuesta la urea el medio cambiará de color, de rosa a rojo intenso, la prueba es positiva.

7.3 Pruebas bioquímicas automatizadas API

- Se preparó una solución salina al 0.9% estéril y se vertieron 10ml en tubos de ensayo.
- Se agregó inóculo de la cepa en un tubo hasta contener una concentración similar a la establecida en el patrón MacFarland, según la prueba a realizar para cada cepa de estudio.

API 20E

Se llenaron los pozos de la bandeja de incubación con agua destilada estéril para crear un ambiente húmedo.

- Con una micropipeta se llenaron los pozos hasta las cúpulas con la suspensión bacteriana para las pruebas CIT, VP y GEL evitando la formación de burbujas.
- Se agregó la solución con inóculo en los pozos sin llenar la cúpula de las demás pruebas.

- Posteriormente, se llenaron las cúpulas con parafina líquida de las pruebas ADH, LDC, ODC, H2S y URE, para crear un ambiente anaerobio.
- Se cerró la caja de incubación y se incubó a 37 °C durante 48 hrs para después realizar la lectura de las pruebas.

Lectura e interpretación

- Se adicionó una gota del reactivo TDA a la prueba TDA, si el color cambia a marrón la prueba es positiva.
- Se adicionó una gota del reactivo de JAMES a la prueba de IND, si el color cambia a rosa la prueba es positiva.
- Se adicionó una gota de los reactivos VP1 Y VP2 a la prueba VP, después de 10 minutos si la prueba cambia de color rosa a rojo la prueba es positiva. Si después de los 10 minutos el color rosa aparece la prueba es negativa.
- Para la reducción de nitratos a nitritos NO₂ y N₂, se adicionó una gota de los reactivos NIT 1 Y NIT 2 a la prueba GLU, si en 5 minutos aparece el color rojo la prueba indica positivo (NO₂). La reacción es negativa si el color es amarillo. Para comprobar la prueba, se agregó Zinc a la prueba GLU, se esperaron 5 minutos, la reacción es positiva (N₂) si el color es amarillo, si es de color naranja la reacción es negativa debido a que los nitratos presentes en el tubo fueron reducidos por el Zinc.
- Las lecturas se realizaron a las 48 y 72 horas después de realizar la prueba, para dejar que los actinomicetos asimilaran los sustratos y evitar los falsos positivos por degradación de sustratos.

Tabla 4. Interpretación de la prueba automatizada API 20 E

Prueba	Resultados	
	Negativo	Positivo
ONPG	Sin color	Amarillo
<u>ADH</u>	Amarillo	Rojo/Naranja
<u>LDC</u>	Amarillo	Rojo/Naranja
<u>ODC</u>	Amarillo	Rojo/Naranja
CIT	Amarillo	Verde-azul
<u>H2S</u>	Sin color	Negro
<u>URE</u>	Amarillo	Rojo/Naranja

TDA	Amarillo	Marrón
IND	Sin color/ Amarillo	Rosa
VP	Sin color	Rosa/Rojo
GEL	Sin difusión	Negro
GLU	Azul/azul- verde	Amarillo/amarillo limón
MAN	Azul/azul- verde	Amarillo
INO	Azul/azul- verde	Amarillo
SOR	Azul/azul- verde	Amarillo
RHA	Azul/azul- verde	Amarillo
SAC	Azul/azul- verde	Amarillo
MEL	Azul/azul- verde	Amarillo
AMY	Azul/azul- verde	Amarillo
ARA	Azul/azul- verde	Amarillo

ONPG= β -galactosidasa, **ADH** = Arginina DiHidrolasa, **LDC**= Lisina Decarboxilasa, **ODC** =Ornitina Decarboxilasa, **CIT**=Citrato (utilización), **H₂S** =producción de H₂S, **URE** =Ureasa, **TDA**=Tryptofano Deaminasa, **IND**= producción de indol, **VP**=Producción de acetoina, **GEL**=Gelatinasa, **GLU**=Fermentación/oxidación glucosa, **MAN**=Fermentación/oxidación manitol, **INO**= Fermentación/oxidación inositol, **SOR**=Fermentación/oxidación sorbitol, **RHA**=Fermentación/oxidación ramnosa, **SAC**=Fermentación/oxidación sacarosa, **MEL**= Fermentación/oxidación melibiosa, **AMY**= Fermentación/oxidación amigdalina, **ARA**= Fermentación/oxidación arabinosa.

API 20NE

- Se llenaron los pozos de la bandeja de incubación con agua destilada estéril para crear un ambiente húmedo.
- Se inocularon los pozos las pruebas NO₃ hasta PNPG sin llenar la cúpula, evitando la formación de burbujas.

- En una ampollita de API AUX Medium se adicionaron 200 µl de la suspensión bacteriana y se mezclaron homogéneamente.
- Se llenaron los tubos hasta la cúpula las pruebas GLU hasta PAC con la suspensión con inóculo de Api AUX Medium.
- Se rellenaron las cúpulas de GLU, ADH y URE con parafina líquida.
- Se cerró la caja de incubación y se incubó a 37 °C durante 48 horas para realizar la lectura de las pruebas.

Lectura e interpretación.

- Se añadió una gota de NIT 1 Y NIT2 a la prueba NO₃, si después de 5 minutos aparece el color rosa-rojo la prueba es positiva. Para comprobar la prueba, se adicionó Zinc y esperaron 5 minutos, la reacción es positiva si no hay color; si es de color rosa-rojo la reacción es negativa porque los nitratos presentes en el tubo fueron reducidos a nitritos por el Zinc.
- Se añadió una gota del reactivo JAMES a la prueba de TRP, la reacción es inmediata y es positiva si aparece el color rosa.
- Si las cúpulas de GLU hasta PAC son opacas o turbias la reacción es positiva.
- Las lecturas se realizaron a las 48 y 72 horas después de realizar la prueba, para dejar que los actinomicetos asimilen los sustratos y evitar los falsos positivos por degradación de sustratos.

Tabla 5. Interpretación de la prueba automatizada API 20NE

Prueba	Resultados	
	Negativo	Positivo
NO ₃	Sin color	Rosa-rojo
TRP	Sin color, verde claro o amarillo	Rosa
<u>GLU</u>	Verde-azul	Amarillo
<u>ADH</u>	Amarillo	Rosa/naranja/rojo
<u>URE</u>	Amarillo	Rosa/naranja/rojo
ESC	Sin color	Gris/café/negro
GEL	Sin color	Negro

PNG	Sin color	Amarillo
GLU	Transparente	Opaco
ARA	Transparente	Opaco
MNE	Transparente	Opaco
MAN	Transparente	Opaco
NAG	Transparente	Opaco
MAL	Transparente	Opaco
GNT	Transparente	Opaco
CAP	Transparente	Opaco
ADI	Transparente	Opaco
MLT	Transparente	Opaco
CIT	Transparente	Opaco
PAC	Transparente	Opaco

NO3=Reducción de nitratos a nitritos, **TRP** =Producción de indol, **GLU**= Fermentación de glucosa, **ADH**=Arginina DiHidrolasa, **URE** =Ureasa, **ESC** =Hidrólisis esculina, **GEL**= Gelatinasa, **PNG**=Para-nitrofenil-β-Dgalactopiranosidasa, **GLU** =Asimilación de glucosa, **ARA**=Asimilación de arabinosa, **MNE**=Asimilación de manosa, **MAN**=Asimilación de manitol, **NAG**= Asimilación de N-acetil-glucosamina, **MAL** =Asimilación maltosa, **GNT**= Asimilación de Gluconato de potasio, **CAP**= Asimilación de ácido caprico, **ADI**= Asimilación de ácido adipico, **MLT**= Asimilación malato, **CIT**= Asimilación de citrato de trisodio, **PAC**=Asimilación de ácido fenil acético.

API ZYM

- Se llenaron los pozos de la caja de incubación con agua destilada para crear un ambiente húmedo.
- Con una micropipeta se llenaron con la suspensión bacteriana (solución salina 0.9 %) todos los pozos hasta las cúpulas.
- Después se cerró la caja de incubación y llevó a incubar a 37 °C durante 24hrs para después realizar lectura de las pruebas.
- Una sola lectura de las pruebas se realizó a las 24 h

Tabla 6. Interpretación de la prueba automatizada API ZYM

Prueba	Enzima	Resultados	
		Negativo	Positivo
1	Control	Sin color	
2	Fosfatasa alcalina	Sin color o amarillo muy claro	Violeta
3	Esterasa (C4)	Sin color o amarillo muy claro	Violeta

4	<u>Esterasa lipasa (C8)</u>	Sin color o amarillo muy claro	Violeta
5	<u>Lipasa (C14)</u>	Sin color o amarillo muy claro	Violeta
6	Leucina arilamidasa	Sin color o amarillo muy claro	Naranja
7	Valina arilamidasa	Sin color o amarillo muy claro	Naranja
8	Cristina arilamidasa	Sin color o amarillo muy claro	Naranja
9	Tripsina	Sin color o amarillo muy claro	Naranja
10	α - cimotoripsina	Sin color o amarillo muy claro	Naranja
11	Fosfatasa ácida	Sin color o amarillo muy claro	Violeta
12	Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	Sin color o amarillo muy claro	Azul
13	α -galactosidasa	Sin color o amarillo muy claro	violeta
14	β -glucoronidasa	Sin color o amarillo muy claro	Violeta
15	β -glucosidasa	Sin color o amarillo muy claro	Azul
16	α -glucosidasa	Sin color o amarillo muy claro	Violeta
17	β -glucosidasa	Sin color o amarillo muy claro	Violeta
18	N-acetil- β -glucosaminidasa	Sin color o amarillo muy claro	Café

19	α -manosidasa	Sin color o amarillo muy claro	Violeta
20	α -fucosidasa	Sin color o amarillo muy claro	violeta

7.4 Prueba de sensibilidad a antibióticos

- Se preparó medio agar dextrosa Sabouraud en placa.
- Se agregó 1 ml de la suspensión bacteriana al medio en placa y se distribuyó uniformemente en toda la caja.
- Con pinzas estériles se pusieron los sensidiscos BB-BBL® sobre las placas inoculadas.
- Se incubaron a 37 ° C hasta su crecimiento.
- Se realizaron las lecturas de la prueba. Si hubo crecimiento alrededor de los discos demuestra resistencia de la cepa frente al antibiótico, si presenta halo de inhibición demuestra sensibilidad frente al antibiótico.

Antibióticos que se emplearon

Tabla 7. Antibióticos

CAZ30 Ceftazidima 30 µg	RA5 Rifampicina 5 µg	B10 Bacitracina 10 µg
S10 Estreptomina 10 µg	AN30 Amikacina 30 µg	AMC30 Amoxicilina 30 µg
CB100 Carbenicilina 100 µg	PIP100 Piperacilina 100 µg	MA30 Cefamandol 30 µg

7.5 Análisis fenotípico

Se creó una matriz de datos en el programa Excel donde las propiedades positivas se registraron como “+” y las negativas como “-”. Cada una de las cepas se comparó con cada una de las restantes utilizando el programa NTSYS (Numerical Taxonomy System) el cual hace lo siguiente: las propiedades entre cada par de cepas en comparación se les estableció un valor numérico, las propiedades iguales en ambas

cepas tuvieron valor de “uno” y las propiedades que no fueron iguales tuvieron valor “cero” (González, 2016).

El grado de semejanza fue determinado por el coeficiente de similitud simple (Ssm).

$$\%S_{sm} = \frac{\text{Número de caracteres compartidos} \times 100}{\text{Número total de caracteres}}$$

Así, de esta manera se realizó un dendograma, que construye un árbol de agrupación de cepas dependiendo de sus similitudes fenotípicas utilizando las pruebas bioquímicas.

7.6 Prueba Genética

Extracción de ADN: Se llevó a cabo la extracción del ADN de acuerdo al protocolo especificado por el fabricante del kit Promega Wizard del laboratorio Genomic.

Se emplearon tubos eppendorf estériles de 1.5 mL, puntas blancas y amarillas esterilizadas, isopropanol y alcohol 70%, realizando todo dentro de una campana de ventilación.

- Se añadió 1 ml de la cepa a un tubo de estéril de 1.5 mL.
- Se centrifugó a 14,000rpm durante 2 minutos y se removió el sobrenadante.
- Las células se resuspendieron añadiendo 480 µl de EDTA 50mM.
- Se 120 µl de lisozima. El propósito del pretratamiento fue para poder romper la pared de las células y tener una eficiente lisis celular.
- La muestra se llevó a incubación a 37 °C durante 1 hora.
- Posteriormente se centrifugó durante 2 minutos a 14,000 rpm.
- Al tubo se le añadieron 600 µl de la solución de Lysis Nulcei y se mezcló.
- Después se colocó en baño María a 80°C por 5 minutos, y se dejó enfriar a temperatura ambiente.
- Se le añadieron 3 µl de la solución de RNasa y se mezcló.
- Se incubó a 37 °C durante 1 hora dejando enfriar a temperatura ambiente.

- Luego se añadieron 200µl de la solución de Precipitación de Proteínas y se mezcló en el vortex unos segundos,
- Se incubó 5 minutos en hielo.
- Se centrifugo a 14,000rpm durante 3 minutos.
- El sobrenadante se transfirió a un tubo estéril nuevo con 600µl de isopropanol y se mezcló para ver las hebras de ADN
- Se centrifugo a 14,000rpm durante 2 minutos y se quitó el sobrenadante.
- Se añadieron 600µl de alcohol al 70 % y se mezcló.
- Se centrifugó a 14,000rpm, quitando el sobrenadante y se dejó secar el tubo con el pellet durante 15 minutos.
- Finalmente, se rehidrató el pellet de ADN añadiendo 100µl de la solución de Rehidratación del kit.

Amplificación del gen 16S rRNA: Para realizar la identificación de los microorganismos se utilizaron los siguientes cebadores universales.

27f: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'

1492r: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

La preparación para la PCR fue:

- 14.3 µL de H₂O
- 2.5 µL de Buffer
- 2.5 µL de cada primer
- 0.2 µL de Taq Polimerasa (laboratorio BioLine)
- 3 µL de ADN

Las condiciones en el termociclador para la amplificación del gen 16S rRNA con 30 ciclos fueron las siguientes:

- Pre-desnaturalización por 5 minutos a 94°C.
- Desnaturalización por 1 minuto a 94°C.
- Alineamiento del cebador por 30 segundos a 59°C
- Amplificación por 1 minuto a 72°C.
- Elongación por 10 minutos a 72°C

Los fragmentos amplificados fueron observados mediante una electroforesis en el gel de agarosa al 1%.

- Se pesó la agarosa y se midió el volumen correspondiente de solución TAE 1X, colocándolos en un matraz Erlenmeyer de 250 mL.
- Se fue agitando suavemente y se calentó hasta la disolución completa.
- Se armó la cámara de electroforesis horizontal y se agregó la agarosa sobre el molde, se dejó solidificar la agarosa y se retiró cuidadosamente el peine.
- Se tomó 5 μ L de muestra y se mezcló con el buffer de carga colocando la mezcla en los pozos de la cámara cuidadosamente.
- Se colocó 3 μ L del marcador de peso molecular (300-10000 pb, Trading New Technologies).
- Se cerró la cámara de electroforesis y se programa a 120 Volts y 300 μ Amperes por 30 minutos.
- Se colocó el gel de agarosa en la cámara de tñido con una solución de bromuro de etidio (BrEt), durante 40 segundos.
- Se transfirió el gel a la plancha del fotodocumentador, colocando la tapa y encendiendo la luz UV y la cámara fotográfica. Observamos si amplificó una banda de 1400pb

Los fragmentos amplificados fueron enviados al servicio de secuenciación MacroGen en Maryland, Estados Unidos.

Identificación de especies

Las secuencias obtenidas se analizaron y editaron con el programa BioEdit (Biological sequences alignment versión 7.2.5). Una vez corregidas las secuencias se generaron secuencias consenso las cuales se compararon en las bases de datos: EzTaxon y GenBank BLAST del NCBI, para la identificación de las cepas.

8. Resultados

Descripción morfológica

En la siguiente tabla y figuras se encuentra la descripción macroscópica de las cepas estudiadas.

Tabla 8. Características morfológicas de las cepas de estudio

Color	Forma	Textura	Tamaño
Naranjas	Irregular	Suave	Colonias chicas
Crema	Lisa-Uniforme	Dura	Colonias grandes
Blancas	Rugosa	Cremosa	
	Botón		

Figura 3. Cepa 4060



Figura 4. Cepa 4085

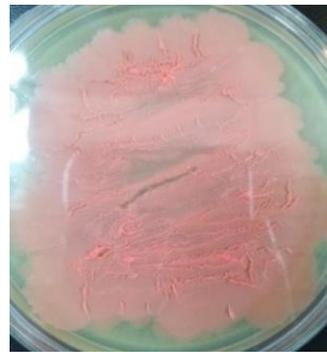


Figura 5. Cepa 4175



Figura 6. Cepa 4730



Descripción microscópica

El aspecto microscópico de las células de las colonias fue de ramificaciones filamentosas que al fragmentarse se observaron las formas cocobacilares. El color morado que presentaron es característico de bacterias Gram positivas.

Figura 7. Cepa 4730

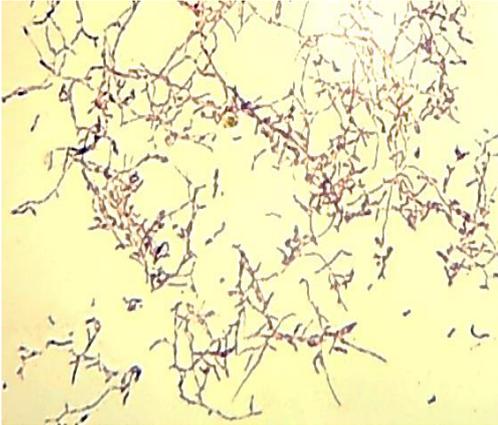


Figura 8. Cepa 4085

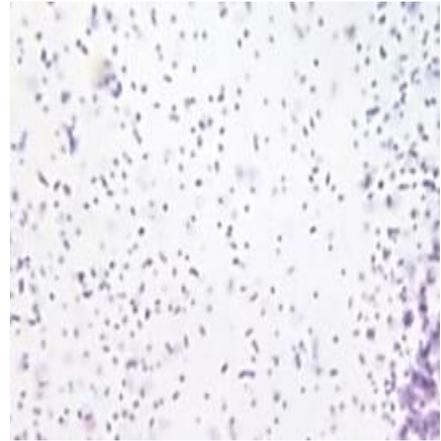


Figura 9. Cepa 4613

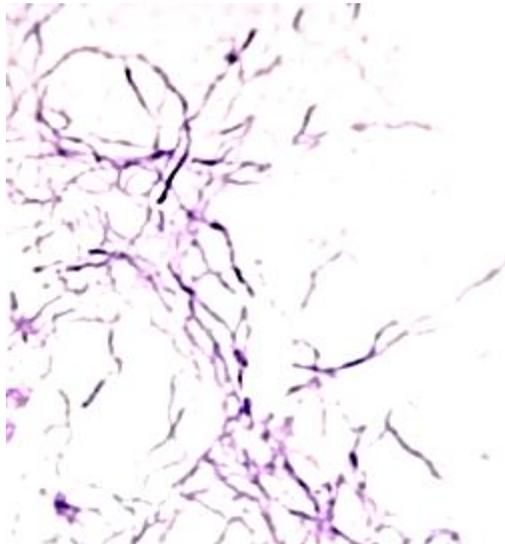


Tabla 9. Pruebas bioquímicas

CEPA		BIOQUÍMICAS			
		CASEÍNA	TIROSINA	UREA	LISOZIMA
1	4605	-	-	-	+
2	4613	-	-	-	+
3	4730	-	-	-	+
4	4404	+	-	+	+
5	4474	-	-	+	+
6	N. 100	+	+	+	+
7	4459	-	-	-	-
8	4431	-	+	-	-
9	4167	-	+	-	-
10	4060	+		-	-
11	4762	+	+	-	-
12	D. congo	-	-	-	-
13	4904	-	-	-	-
14	4090	-	-	-	-
15	4437	-	-	-	-
16	4085	-	-	-	-
17	4175	-	-	-	-
18	4062	-	-	-	-
19	4118	-	-	-	-
20	4155	-	-	-	-
Total positivos		4	4	3	6

La tabla 9 muestra las pruebas bioquímicas tradicionales de las cepas de estudio, en la cual no se observa ningún tipo de patrón.

Tabla 10. Sensibilidad a antibióticos

CEPA		SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS						
		Ceftazidima 30 mg	Estreptomicina 10 mg	Carbenicilina 100 mg	Rifampicina 5 mg	Amikacina 30 mg	Piperacilina 100 mg	Bacitracina 10 mg
1	4605	-	-	-	-	+	-	-
2	4613	-	-	-	-	+	-	-
3	4730	-	-	-	-	+	-	-
4	4404	-	-	-	-	+	-	-
5	4474	-	-	-	-	+	-	-
6	N.100	-	-	-	-	-	-	+
7	4459	-	-	-	-	+	-	-
8	4431	-	-	-	-	+	-	-
9	4167	-	-	-	-	+	-	-
10	4060	-	-	-	-	+	-	-
11	4762	-	-	-	-	+	-	+
12	D. congo	-	-	-	-	+	-	-
13	4904	-	-	-	-	+	-	-
14	4090	-	-	-	-	+	-	-
15	4437	-	-	-	-	+	+	+
16	4085	-	-	-	-	+	-	-
17	4175	-	-	-	-	+	-	-
18	4062	-	-	-	-	-	-	-
19	4118	-	-	-	-	+	-	+
20	4155	-	-	-	-	-	-	-
Total positivos		0	0	0	0	17	1	4

En la prueba de sensibilidad a antibióticos (ver tabla 10) se tomó el criterio de sensibilidad (+) y resistencia (-) de cada cepa de estudio frente a los antibióticos empleados.

Las cepas de estudio presentaron mayor sensibilidad a los antibióticos amikacina y amoxicilina, y pocas cepas presentaron inhibición frente a bacitracina y piperacilina, sin embargo, no se observó sensibilidad frente a los antibióticos restantes.

Tabla 11. Prueba automatizada API 20E

CEPA	API 20 E																			
	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
4605	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4613	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4730	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4404	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4474	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
N. 100	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4459	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4431	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4167	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4060	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4762	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D. congo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4904	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4090	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4437	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4085	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4175	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4062	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4118	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4155	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total positivos	5	0	0	0	4	0	8	2	1	11	10	6	0	0	0	0	0	0	0	0

ONPG β-galactosidasa	H2S producción de H2S	GEL Gelatinasa	RHA Fermentación/oxidación ramnosa
ADH Arginina DiHidrolasa	URE Ureasa	GLU Fermentación/oxidación glucosa	SAC Fermentación/oxidación sacarosa
LDC Lisina Decarboxilasa	TDA Triptofano Deaminasa	MAN Fermentación/oxidación manitol	MEL Fermentación/oxidación melibiosa
ODC Ornitina Decarboxilasa	IND producción de indol	INO Fermentación/oxidación inositol	AMY Fermentación/oxidación amigdalina
CIT Citrato (utilización)	VP Producción de acetoina	SOR Fermentación/oxidación sorbitol	ARA Fermentación/oxidación arabinosa

La mayoría de las cepas de estudio (ver tabla 11) dieron positivo a las pruebas de producción de acetoina (VP), la gelatinasa (GEL) y ureasa (URE), en las demás pruebas no se observaron resultados positivos como patrón.

Tabla 12. Prueba automatizada API 20NE

CEPA	API 20 NE																						
	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC			
4605	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
4613	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-			
4730	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-			
4404	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-			
4474	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-			
N. 100	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-			
4459	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-			
4431	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-			
4167	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-			
4060	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-			
4762	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-			
D. congo	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+			
4904	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+			
4090	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+			
4437	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-			
4085	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+			
4175	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+			
4062	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
4118	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
4155	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Total positivos	16	0	0	0	9	17	14	15	10	1	0	3	7	0	4	2	5	15	3	5			
NO3	Reducción de nitratos a nitritos					ESC	Hidrólisis esculina					MNE	Asimilación de manosa					CAP	Asimilación de ácido caprico				
TRP	Producción de indol					GEL	Gelatinasa					MAN	Asimilación de manitol					ADI	Asimilación de ácido adipico				
GLU	Fermentación de glucosa					PNG	Para-nitrofenil-β-Dgalactopiranosidasa					NAG	Asimilación de N-acetil-glucosamina					MLT	Asimilación malato				
ADH	Arginina DiHidrolasa					GLU	Asimilación de glucosa					MAL	Asimilación maltosa					CIT	Asimilación de citrato de trisodio				
URE	Ureasa					ARA	Asimiliación de arabinosa					GNT	Asimilación de Gluconato de potasio					PAC	Asimilación de ácido fenil acético				

La mayoría de las cepas de estudio dieron positivo en la prueba de hidrólisis del glucósido esculina, la prueba para la asimilación del azúcar p-nitrofenil-β-D-galactopiranosidasa y las pruebas de asimilación de los azúcares glucosa y maltosa. Además, también se observó que la mayoría de las cepas tienen la capacidad de reducir nitratos a nitritos (ver tabla 12).

Tabla 13. Prueba automatizada API ZYM

CEPA	API ZYM																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
4605	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4613	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
4730	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
4404	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
4474	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
N. 100	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-
4459	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
4431	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
4167	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-
4060	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-
4762	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D. congo	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
4904	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
4090	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
4437	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
4085	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
4175	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-
4062	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4118	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4155	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total positivos	7	10	8	8	4	16	16	16	8	7	15	15	0	6	0	12	15	4	2	0

1 Control	6 Leucina arilamidasa	11 Fosfatasa ácida	16 α -glucosidasa
2 Fosfatasa alcalina	7 Valina arilamidasa	12 Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	17 β -glucosidasa
3 Esterasa (C4)	8 Cistina arilamidasa	13 α -galactosidasa	18 N-acetil- β -glucosaminidasa
4 Esterasa lipasa (C8)	9 Tripsina	14 β -glucuronidasa	19 α -manosidasa
5 Lipasa (C14)	10 α - cimetripsina	15 β -glucosidasa	20 α -fucosidase

La prueba enzimática API ZYM nos muestra que la mayoría de las cepas de estudio tienen la capacidad enzimática de leucina arilamidasa, valina arilamidasa, cistina arilamidasa, fosfatasa ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolasa y la enzima B-glucosidas. Para el resto de las pruebas los resultados son variables.

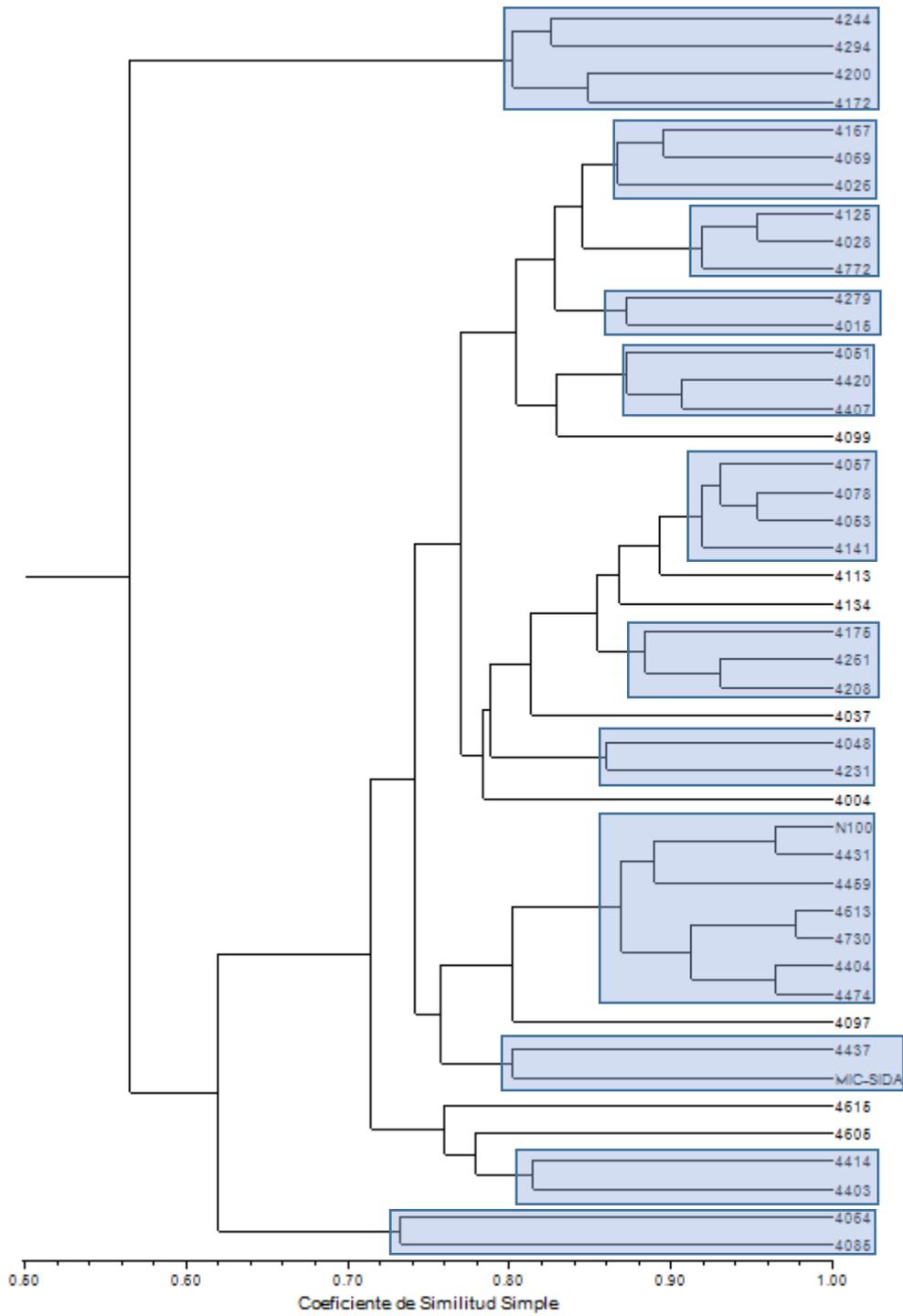


Figura 11. Árbol fenotípico.

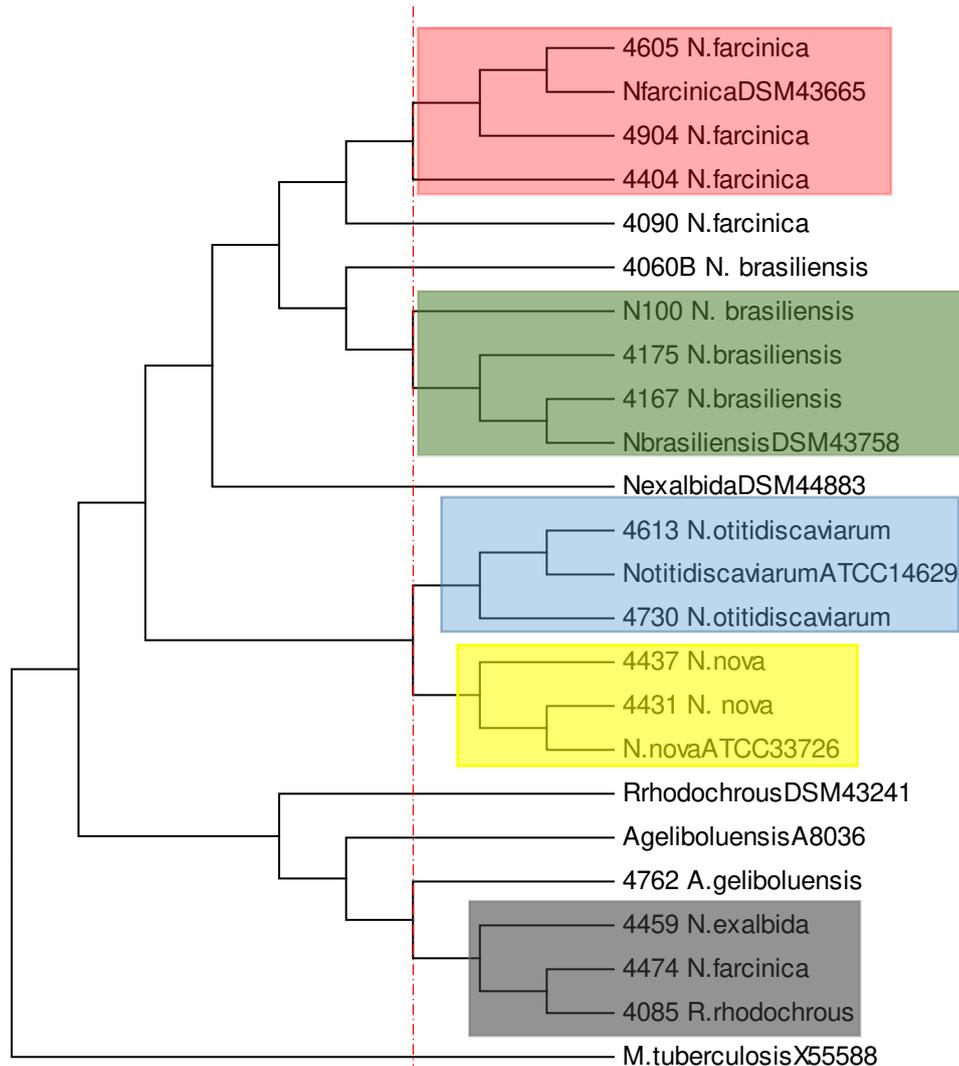


Figura 12. Árbol genético.

Se realizó un árbol filogenético para agrupar las cepas de estudio con respecto a sus similitudes del gen 16S rRNA. Se utilizó el método Neighbor-Joining, kimura 2-parámetros y un Bootstrap de 1000. Los cuadros de colores (ver figura 12) agrupan las cepas similares: el cuadro rojo es el cluster de *N. farcinica* y una cepa que queda fuera del cluster, sin embargo, está relacionada; el cuadro verde es el cluster de *N. brasiliensis* y una cepa que queda fuera, pero está relacionada; el cuadro azul es el cluster de *N. otitidiscaviarum*; el cuadro amarillo es el cluster de *N. nova*; las cepas 4459, 4474 y 4085 no son de la misma especie y se agrupan en el cluster del cuadro gris, estas cepas deben ser estudiadas profundamente; y la cepa 4762 no se agrupa

cercanamente con la cepa tipo de su especie, sin embargo parece estar relacionada.

9. Discusión

Las cepas de estudio tuvieron muchas diferencias respecto a su morfología, las colonias eran de formas irregulares, lisas, rugosas y de botón, así como de diferentes colores, el predominante fue el naranja, sin embargo, incluso las cepas de la misma especie crecieron de forma diferente.

La diversidad de crecimiento colonial que tienen las cepas no nos sirve como criterio para la identificación de actinomicetos. Por otra parte, el crecimiento colonial tampoco sirve como criterio de identificación debido a que todas, incluso de diferente género se observan al microscopio con las mismas formas

La realización de pruebas bioquímicas es importante para conocer el metabolismo de los actinomicetos, y así aprovechar los metabolitos producidos por ellos que pueden emplearse en diferentes ámbitos.

En las pruebas automatizadas API, las pruebas que destacaron con resultados positivos en la mayoría de las cepas de estudio fueron la de producción de acetoina (VP) quiere decir que las cepas de estudio tienen la capacidad para producirla, la prueba de esculina (ESC) tienen las enzimas necesarias para utilizar como sustrato este glucósido, así como la asimilación de azúcares como la p-nitrofenil- β -D-galactopiranosidasa, glucosa y maltosa. Mediante estas pruebas observamos la capacidad enzimática como la leucina arilamidasa, valina arilamidasa, cistina arilamidasa entre otras, en cepas de actinomicetos utilizadas en el estudio.

La sensibilidad a antibióticos es una prueba muy útil para poder determinar un tratamiento adecuado para infecciones causadas por actinomicetos (nocardiosis y actinomicetoma), las pruebas realizadas a las cepas de estudio indican que los antibióticos eficaces para tratar este tipo de infecciones son la amikacina y amoxicilina.

Los resultados de las pruebas bioquímicas y la sensibilidad a antibióticos se anotarán en un catálogo de descripciones para crear una colección de actinomicetos ordenada e informativa.

Realizar pruebas bioquímicas no es suficiente para hacer una identificación hasta nivel de especie, por eso se tienen que hacer pruebas adicionales de biología molecular como la prueba de amplificación del gen 16S rRNA que es la más empleada en laboratorios para identificar las cepas y darles nombre de género y especie. Mediante la identificación molecular se identificaron los géneros *Nocardia*, *Actinomadura* y *Rhodococcus*, lo que no se pudo lograr haciendo únicamente pruebas bioquímicas.

El árbol filogenético (figura 10) nos muestra la correlación evolutiva de las cepas de estudio, donde observamos que se forman grupos dependiendo de las especies identificadas.

En el árbol fenotípico (figura 11) se puede observar la formación de los clusters (grupo de especies) de las cepas que tienen relación de acuerdo a sus características fenotípicas.

El árbol genético (figura 12) nos muestra las agrupaciones de las cepas de estudio que se formaron de acuerdo a las similitudes del gen 16S rRNA. Los cuadros de colores muestran las agrupaciones de cepas similares. Las especies encontradas (clusters) fueron *N. farcinica*, *N. brasiliensis*, *N. otitidiscaviarum* y *N. nova*. Se observó que las cepas 4459, 4474 y 4085 no son de la misma especie (cuadro gris), por lo que deben ser estudiadas profundamente. Y la cepa 4762 no se agrupa cercanamente con la cepa tipo de su especie sin embargo parece tener relación. Aunque no se agrupan de la forma esperada estas cepas, puede indicar que son una nueva especie y podrían ser evaluadas en otro estudio.

10. Anexos

Ejemplos de Cepas de Actinomicetos de la colección 4000 del Laboratorio de Producción de Biológicos.

Macroscópica

Cepa 4060



Cepa 4730



Cepa 4085



Cepa 4167



Cepa 4175



Cepa 4762



11. Referencias

1. Evangelista, Z. y Moreno, A. (2007). Metabolitos Secundarios de Importancia Farmacéutica producidos por actinomicetos. *BioTecnología* 11(3), 37-50.
2. Evangelista, Z., Quiñones, E. y Rincón, G., (2017). Potencial biotecnológico de las actinobacterias aisladas de suelos de México como fuente natural de moléculas bioactivas: compuestos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas. *Temas de ciencia y Tecnología*, 21(63)39-51.
3. Fernández, A., García, C., Saéz, J. y Valdezate, S. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. SEIMC Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
4. Filogenias, Bioinformatics at COMAV, s.f. Recuperado de: https://bioinf.comav.upv.es/courses/intro_bioinf/filogenias.html
5. Franco, M., (2008). *Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas Rizobacterias con hongos formadores de Micorrizas (Tesis doctoral)*. Universidad de Granada, España.
6. González, A. (2013). *Manual Electrónico de Actinomicetos*. (Tesis de grado). Universidad Nacional Autónoma de México.
7. González, J., (2016) *Reconsideración Taxonómica de Actinomicetos Aislados de Suelos Mexicanos*. (Tesis de grado). Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xocimilco, México.
8. González, P. y Cona, E., (2006). *Nocardia asteroides*. Rev. Chi. De Infectología 23 (3).
9. González, Y., (2010) *Los Actinomicetos: Una Visión Como Promotores De Crecimiento Vegetal (Tesis doctoral)*. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
10. Koneman, E., Winn, W., Allen, S., Janda, W., Procop, G., Schreckenberger, P. y Woods, G. (2008). *Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas a color*. 6° Ed., Buenos Aires Argentina: Ed. Panamericana.
11. LPSN- List of Prokariotic Names with Standing in Nomenclature. Recuperado de

12. Méndez, I. Micetoma, Departamento de microbiología y parasitología, UNAM. Recuperado de http://microypara.facmed.unam.mx/?page_id=797
13. Paillié, D. (2011). *Aislamiento y caracterización preliminar de genes de policétido sintetas tipo I en actinomicetos aislados a partir de hormigas cortadoras de hojas Atta cephalotes* (Tesis de grado). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.
14. Parada, B., Marget, R., y Vallejo, M., (2017). Aislamiento y caracterización parcial de actinomicetos de suelos con actividad antimicrobiana contra bacterias multidrogo-resistente. *Rev. Colomb. De Biotecnología*, 19(2), 15-23.
15. Paul A. Rochelle, John C. Fry, R. John Parkes, Andrew J. Weightman, DNA extraction for 16S rRNA gene analysis to determine genetic diversity in deep sediment communities, *FEMS Microbiology Letters*, 1992; 100:59–65
16. Ramírez, N., Serrano, J. y Sandoval, H. (2006). Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 37(3), 56-71.
17. Reyes, A., Rincón, G., Evangelista, Z., Quiñones, E., y López, L., (2017). Lucha Entre Microbios: Una Herramienta Para El Control De Enfermedades De Plantas. *Revista Digital Universitaria*, 16 (11).
18. Rink, R. (1992) *On-Farm Composting Handbook*, Northeast Regional Agricultural Engineering Service, Cooperative Extension.
19. Sánchez, K., Sandoval, H., Ramírez, N., Bergeron, E., Boiron, P., Sánchez, N. y Rodríguez, V. (2017). Molecular Identification of *Nocardia* Species using soda gene. *New Microbe and New Infect* 19:96-116.
20. Sandoval, H., (1993). *Actinomicetos*. México. Ed. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.
21. Serrano, J., Sandoval, H. y Beaman, B. (2007). *Actinomicetoma*. México. Ed. Plaza y Valdés.
22. Serrano, J. y Sandoval, H. (2005). *Identificación y Diagnóstico de Actinomicetales Patógenos*. Venezuela. Ed. Universidad de los Andes.

23. Uzcátegui, M., Serrano, J., Boiron, P., Rodríguez, V., Couble, A., Moniée, D., Sánchez, K., Sandoval, H., Reviakina, V., Panizo, M. y Mendoza, M., (2009). Clasificación e identificación de especies de actinomicetos: un estudio fenotípico comparativo. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29:91-97.

No. de páginas: 39

Lugar de realización: Laboratorio de Producción de Biológicos,
Departamento de Sistemas Biológicos, UAM-X

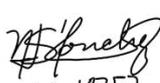
Prácticas realizadas en:

Proyecto genérico: Evaluación de productos relacionados a la salud

Contiene:

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Fotografías | <input checked="" type="checkbox"/> Ilustraciones |
| <input type="checkbox"/> Gráficas | <input type="checkbox"/> Mapas |
| <input checked="" type="checkbox"/> Tablas | <input type="checkbox"/> Diagramas |
| <input type="checkbox"/> Trípticos | |

Vo.Bo. Asesores: _____


N° Ec. 18752

Fecha liberación texto completo: 20191223

NOTA: La versión digital de este reporte, solo podrá ser consultada en cualquier Unidad académica de la Universidad, incluyendo a Rectoría General



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO
UAM
División de Ciencias Exactas e Ingeniería

Departamento de Sistemas Biológicos
Licenciatura en Química Farmacéutica

Descripción morfológica, metabólica y fisiológica de
4000 de actinobacterias del Laboratorio de
Biológicos.

Rodríguez Saldaña, Yadira Ivette

Asesores

Interno: Q.F.B. Nora Lidia Sánchez Saucedo

Externo: M. en C. Janette B. González Navarrete

Sistemas Biológicos
Química Farmacéutica Biológica

Descripción morfológica, metabólica y genética de la colección 4000 de actinobacterias del Laboratorio de Producción

Rodríguez Saldaña, Yadira Ivette 2123056513

Interno: Q.F.B. Nora Lidia Sánchez Saucedo
Externo: M. en C. Janette B. González Nava

08 de Junio de 2021

39

Laboratorio de Producción de Biológicos, Departamento de Sistemas Biológicos, UAM-X

Evaluación de productos relacionados a la salud

X

X

20191223