



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

LICENCIATURA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

Tema: Aislamiento, caracterización y minería de genoma de bacterias aisladas de suelo contaminado.

REPORTE DEL SERVICIO SOCIAL

Asesora interna: Nora Lidia Sánchez Saucedo
No. Económico: 18752

Asesora externa: Janette Berenice González Nava
Laboratorio de Microbiología Médica y Ambiental, UAEMex.

Nombre de la alumna: María Isabel López Vázquez
Matrícula: 2192030990

Lugar de realización del proyecto: Laboratorio de Producción de Biológicos, edificio N-202 UAM Xochimilco

Fecha de inicio: 22 de Julio del 2022

Fecha de término: 31 de Enero del 2023

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	2
OBJETIVO GENERAL	2
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
MARCO TEÓRICO	3
ACTINOBACTERIAS	3
➤ Generalidades	3
➤ Ciclo de vida de las actinobacterias	3
➤ Condiciones de crecimiento celular	4
➤ Características morfológicas	5
➤ Compuestos Bioactivos Microbianos (CBMs).....	6
➤ Importancia.....	6
➤ Actinobacterias ambientales.....	7
PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS.....	16
USO DEL 16S rRNA COMO HERRAMIENTA FILOGENÉTICA Y TAXONÓMICA. TÉCNICAS UTILIZADAS.....	17
➤ Extracción de DNA bacteriano	18
➤ Método molecular de identificación bacteriana	18
➤ Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	19
➤ Electroforesis en gel de agarosa para visualizar DNA	21
SISTEMAS BIOSINTÉTICOS PKS Y NRPS.....	21
➤ Sistema PKS	22
➤ Sistema NRPS	24
➤ Importancia de la detección de sistemas biosintéticos en actinobacterias	25
METODOLOGÍA	27
Obtención de las muestras de tierra	27
Aislamiento de cepas bacterianas ambientales	27
Pruebas fenotípicas	28
a) <i>Morfología macroscópica</i>	28

b) <i>Morfología microscópica</i>	29
c) <i>Pruebas bioquímicas</i>	29
<i>Preparación del medio para la determinación de descomposición de caseína.</i>	30
<i>Preparación del medio para la determinación de descomposición de tirosina.</i>	30
<i>Preparación del medio para la determinación de descomposición de urea.</i> ...	30
<i>Preparación del medio para la determinación de resistencia a la lisozima</i>	31
Prueba de sensibilidad a antibióticos.....	31
Prueba de actividad antimicrobiana.....	31
Técnica de crioconservación para preservar las cepas	33
Extracción de DNA bacteriano.....	33
Amplificación del gen 23S como prueba de pureza.....	34
Amplificación de los sistemas biosintéticos PKS-I y NRPS-I	35
Identificación de las cepas por amplificación del gen 16S rRNA	36
Análisis filogenético con el uso de herramientas bioinformáticas	37
 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	 39
Aislamiento de cepas bacterianas ambientales	39
Pruebas fenotípicas	39
Pruebas bioquímicas	42
Prueba de sensibilidad a antibióticos.....	43
Prueba de actividad antimicrobiana.....	45
Extracción de DNA bacteriano.....	48
Amplificación del gen 23S como prueba de pureza.....	48
Amplificación de los sistemas biosintéticos PKS-I y NRPS-I	49
Identificación de las cepas por amplificación del gen 16S rRNA	52
Análisis filogenético con el uso de herramientas bioinformáticas	53
 CONCLUSIONES	 54
 ANEXOS	 55
Anexo A. Imágenes macroscópicas y microscópicas de las cepas de estudio..	55
 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 61

INTRODUCCIÓN

Las actinobacterias, también conocidas como actinomicetos, forman parte de un grupo de bacterias muy diverso, se encuentran distribuidas en ambientes como el suelo, la raíz de las plantas y en sedimentos de agua dulce y salada. Se encargan de realizar actividades importantes en los ecosistemas, destacando su capacidad para descomponer la materia orgánica del suelo (especialmente biopolímeros como la lignocelulosa, almidón y quitina), y para producir compuestos bioactivos con actividad antagónica contra microorganismos patógenos (15).

La mayoría de estas bacterias son aerobias, Gram positivas; algunas presentan desarrollo y crecimiento unicelular, otras especies presentan crecimiento micelial filamentoso formado por hifas no septadas (15) (37).

Con el paso de los años, estos microorganismos han adquirido una gran importancia dentro del campo biotecnológico gracias a la capacidad que poseen para sintetizar metabolitos secundarios que funcionan como precursores para el desarrollo de antibióticos y otras moléculas bioactivas; la mayor producción de dichas moléculas se le ha atribuido al género *Streptomyces*, seguido de otros como *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Streptoverticillium*, *Actinoplanes*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora* y *Streptosporangium*. La biosíntesis toma lugar gracias a la presencia de enzimas policétido sintasas (PKS) y sintasas de péptidos no ribosómicas (NRPS), las cuales constituyen los sistemas biosintéticos (24).

El presente proyecto se realizó de manera experimental en el laboratorio de Producción de Biológicos localizado en el edificio N-202 de la UAM Xochimilco, se aislaron bacterias de muestras de suelo contaminado con hidrocarburos, (dando prioridad a aquellas cepas con características de la familia *Actinomycetaceae*), se les realizó un análisis morfológico, pruebas bioquímicas, pruebas de sensibilidad a antibióticos, la evaluación de su actividad antimicrobiana contra bacterias multirresistentes, la detección de sistemas biosintéticos en su genoma y un análisis filogenético amplificando el gen 16S.

JUSTIFICACIÓN

Las bacterias que crecen en tierras provenientes de suelos contaminados con hidrocarburos presentan las características esenciales para poder subsistir en condiciones que podrían considerarse “anormales” debido a la presencia de sustancias contaminantes como el petróleo. Las actinobacterias son microorganismos que se encuentran distribuidos principalmente en los suelos, al estar presentes en dicho ambiente existe la posibilidad de que puedan hallarse especies con características extremófilas (15).

La importancia del presente trabajo experimental radica en el papel que tienen estos microorganismos dentro de la medicina, la agricultura y la veterinaria, pues a lo largo del tiempo se ha descubierto que los metabolitos secundarios producidos por estas bacterias funcionan como precursores para la síntesis de antibióticos, anticancerígenos, antivirales, y agentes antiparasitarios (29); por lo tanto, al realizar un estudio a muestras de suelo (hábitat común en el que suelen encontrarse estas bacterias) será posible aislar y purificar a cepas de actinobacterias para someterlas a un **análisis bioquímico** que permita conocer su metabolismo, un **análisis fenotípico** para conocer su morfología colonial, un **análisis genético** que permita verificar la presencia de sistemas biosintéticos y un **análisis filogenético** para conocer su historia evolutiva; todo lo anterior con el objetivo final de poder realizar una identificación acertada de las cepas aisladas y conocer un poco de la biodiversidad bacteriana presente en los suelos.

OBJETIVO GENERAL

- Aislar, caracterizar y realizar minería de genoma a bacterias provenientes de suelos contaminados con hidrocarburos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar y realizar pruebas bioquímicas a las cepas de estudio.
- Extraer ADN de las cepas aisladas e identificar la presencia de sistemas biosintéticos.
- Evaluar actividad antimicrobiana de las actinobacterias aisladas contra cepas multirresistentes.
- Realizar pruebas de sensibilidad a antibióticos de las cepas aisladas de actinobacterias.
- Encontrar relaciones filogenéticas de las cepas utilizadas y describir la diversidad bacteriana del suelo.

MARCO TEÓRICO

ACTINOBACTERIAS

➤ Generalidades

Las actinobacterias, también conocidas como actinomicetos, son un grupo de bacterias Gram positivas que tienen la capacidad de formar un micelio filamentosos ramificado, pueden producir esporas y algunas de ellas también pueden formar un micelio aéreo. Se les ha llegado a comparar con los hongos debido a que comparten semejanzas respecto al ciclo de vida de dicho grupo. No obstante, en la pared celular de las actinobacterias se observa la presencia de peptidoglicano y el micelio formado por éstas es mucho más delgado que el de los hongos, características que han logrado establecer la diferencia entre ambos tipos de microorganismos (31).

Las actinobacterias son consideradas microorganismos saprófitos, es decir, obtienen su energía de materia orgánica muerta o en putrefacción y por tal motivo, cumplen un importante rol en la descomposición de la materia orgánica y el ciclo del carbono mediante la producción de diversas enzimas hidrolíticas y ligninolíticas. Así mismo, representan entre el 20 y 60 % de la población microbiana total del suelo, pero también pueden encontrarse en ambientes acuáticos tanto dulces como marinos (29).

➤ Ciclo de vida de las actinobacterias

Debido a que son bacterias filamentosas con crecimiento micelar, sus esporas tienen un ciclo de vida latente, es decir, son capaces de permanecer inactivas por largos periodos en el suelo. De hecho, se han recuperado esporas viables de muestras de suelo almacenadas por más de 70 años (14).

El ciclo de vida más estudiado y común de las actinobacterias corresponde al género *Streptomyces* (Figura 1) el cual básicamente consiste en la formación de hifas ramificadas que luego forman un micelio vegetativo, mientras se dispersan a través de esporas que se forman sobre estructuras reproductivas especializadas llamadas hifas aéreas. Dicho en otras palabras, cuando las esporas se encuentran en un ambiente favorable, van a germinar, dando lugar a hifas que crecen por extensión de la punta hasta formar un micelio. Cuando existe una carencia de nutrientes para las células, tienen lugar diferenciaciones

morfológicas, como la formación de hifas aéreas, las cuales se dividirán en cadenas de preesporas para luego formar esporas maduras con capas gruesas que continúen con su ciclo de vida (48).

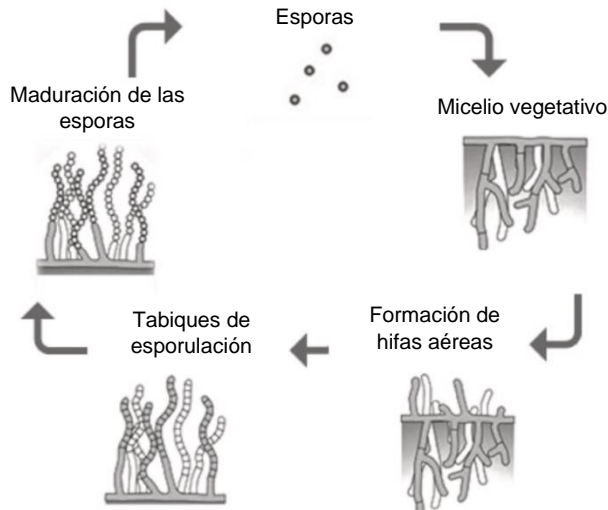


Figura 1. Ciclo de vida de los *Streptomyces* (48).

No obstante, también se presentan otros tipos de ciclo de vida en algunas actinobacterias, como el de los cocos y bacilos del género *Rhodococcus*. Este ciclo comienza con la etapa de coco o bacilo corto, para posteriormente mostrar diferentes etapas morfológicas, como la germinación solo en varillas cortas, la formación de filamentos, ramificaciones elementales, o, en algunas especies de rodococos, la producción de hifas muy ramificadas en las formas más diferenciadas. Y, al finalizar el ciclo, se da la fragmentación de estos filamentos o bacilos resultando en la producción de cocos (48).

➤ **Condiciones de crecimiento celular**

Este tipo de bacterias crece preferentemente en medios como Sabouraud, Bennett y Lowenstein-Jensen, formando filamentos ramificados (hifas) aéreas, que poseen cadenas de conidias que no se fragmentan. Únicamente *Streptomyces*, *Nocardia*, *Actinomadura* y *Nocardiosis* forman micelios aéreos en los cultivos (23).

El crecimiento celular suele observarse alrededor de los dos a diez días de sembrado, si se mantiene en incubación a 37°C o, aún mejor, a 30°C. Se ha observado que condiciones de temperatura superiores a 55°C afectan de manera negativa al proceso de germinación (48).

La mayoría de las actinobacterias crecen a un pH que oscila entre 5.0-9.0, siendo el óptimo de 6.5-8.0, no obstante, también se han descrito algunos géneros acidófilos y otros alcalófilos (Tabla 1) (48).

Tabla 1. Ejemplos de actinobacterias acidófilas y alcalófilas (48).		
Clasificación	Ejemplos (Géneros)	Condiciones
Acidófilas	<i>Acidimicrobium, Ferrimicrobium, Ferrithrix, Aciditerrimonas, Acidothermus, Catenulispora, Streptacidiphilus, Streptomyces.</i>	pH 1.8-4
	Acidotolerantes: <i>Micromonospora, Streptomyces</i>	pH 4.8-9.6
Alcalófilas	<i>Arthrobacter, Cellulomonas, Corynebacterium, Dietzia, Janibacter, Jiangella, Kocuria, Zhihengliuella, Nesterenkonia, Nocardiosis, Nitriliruptor, Gordonida, Marmoricola, Streptomyces</i>	Alcalófilas pH 10-11 Moderadamente alcalófilas pH 7-10 Tolerantes a álcali pH 6-11

Por otra parte, se conocen algunas actinobacterias con características halófilas y halotolerantes: en el género *Nocardiosis* se encuentran 16 especies halófilas, de las cuales *Actinopolyspora algeriensis* y *Actinopolyspora mzabensis* tienen la capacidad de crecer en presencia de hasta un 32% de NaCl (p/v), así como también en la especie *Rubrobacter braccarensis* se observa la tolerancia del 3-30% (p/v) de sal (48).

➤ **Características morfológicas**

La mayoría de las colonias presentan un aspecto ceroso y polvoso, así como un color blanco grisáceo, variando entre el crema y el negro (como es el caso de *Streptomyces somaliensis*). Sin embargo, se sabe que estas características no son específicas, y van a depender de las condiciones de cultivo (23).

➤ **Compuestos Bioactivos Microbianos (CBMs)**

Las actinobacterias en general, son conocidas por producir una gran cantidad de metabolitos especializados con diversas aplicaciones, provenientes de un metabolismo primario y secundario (14).

Los metabolitos primarios son esenciales para el microorganismo y están implicados en su crecimiento, desarrollo y reproducción; consisten en polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, ácidos grasos y otras moléculas necesarias para que el organismo pueda sobrevivir (14). Por otro lado, los metabolitos secundarios no son imprescindibles para su supervivencia como los primarios, pero juegan un papel muy importante en la adaptación al estrés ambiental y en la defensa frente a potenciales cepas invasoras (36); estos también son llamados *Compuestos Bioactivos Microbianos (CBMs)* y suelen ser antibióticos, surfactantes, sideróforos (moléculas de bajo peso con gran afinidad por el hierro), y entre muchos otros (14).

Se sabe que, aproximadamente el 40% de los productos naturales conocidos, reportados y registrados en artículos científicos y patentes de hace una década, provienen de CBMs. Adicionalmente, el 75% los CBMs con capacidad antibiótica fueron obtenidos de actinobacterias (14). Particularmente, aquellas que son halófilas poseen un amplio potencial para producir metabolitos secundarios que pueden ser utilizados en áreas como: medicina, farmacia, microbiología industrial, veterinaria, agronomía, biotecnología y fitopatología, de ahí resulta que hoy en día representan un grupo de gran interés para diversas líneas de investigación (1).

➤ **Importancia**

El papel que desempeñan estos microorganismos en el medio ambiente es muy importante, ya que desintegran determinados compuestos que las bacterias comunes y los hongos filamentosos no pueden descomponer; además, la actividad metabólica de las actinobacterias deriva en la producción de metabolitos secundarios que desempeñan un papel primordial en el mantenimiento, señalización y colonización de su hábitat, pues regulan la composición de las comunidades microbianas por medio de antibiosis (30). Algunas de las moléculas sintetizadas por estos microorganismos han resultado ser compuestos bioactivos precursores de agentes anticancerígenos, inmunorreguladores, antivirales, agentes antiparasitarios y principalmente antibióticos, los cuales corresponden a diversas estructuras químicas como aminoglucósidos (estreptomicina y kanamicina),

glicopéptidos (vancomicina), macrólidos (eritromicina), β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas), nucleósidos (puromicina), péptidos de síntesis no ribosomal (gramicidina, bacitracina), policétidos (actinorrudina, anfotericina), y entre otros más (29).

Se ha observado que el género *Streptomyces* es el más abundante dentro de las actinobacterias del suelo (30), y en los últimos 50 años ha destacado como el principal productor de la mayoría de los antibióticos de uso frecuente en clínica humana y/o animal (29), seguido de otros géneros como *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Streptoverticillium*, *Actinoplanes*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora* y *Streptosporangium* (24), los cuales igualmente han sido comúnmente identificados en muestras de suelos (7).

No obstante, la obtención de dichos compuestos bioactivos tiene su complejidad, pues implica la selección de un nicho ecológico, largos procesos de aislamiento del microorganismo de interés y extensas estrategias de extracción y purificación de los compuestos. Además de que existe la problemática de que muchos metabolitos son sintetizados a la par de otras rutas metabólicas, ocasionando un menor rendimiento en el proceso y una mayor dificultad para identificar el metabolito de interés, viéndose necesario recurrir a técnicas más avanzadas y complejas de manipulación genética y biología molecular (14).

➤ **Actinobacterias ambientales**

○ ***Streptomyces***

Este género ha sido aislado principalmente de suelos, vegetales en descomposición y de plantas, resultando ser de gran interés para la investigación (23). En 1952, Selman Waksman recibió el premio Nobel en fisiología y medicina por utilizar a *S. griseus* para la producción a nivel industrial del antibiótico estreptomina. En los últimos años, especies como *S. coelicolor* (Figura 2) y *S. avermitilis* han sido ampliamente utilizadas para el desarrollo de herramientas moleculares mediante la manipulación a su genoma con el objetivo de lograr la expresión selectiva de compuestos bioactivos; así como también, *S. venezuelae*, una cepa de crecimiento relativamente rápido, que ha sido modificada genéticamente para incrementar los rendimientos de producción de metabolitos primarios y secundarios (14).

Las especies de *Streptomyces* se conocen en la actualidad como las principales productoras de metabolitos secundarios con múltiples aplicaciones en agricultura, biotecnología y medicina (14).



Figura 2. Crecimiento de *S. coelicolor* en medio sólido (17).

○ ***Micromonospora***

Son un género de actinomicetos que se caracterizan por carecer de micelio aéreo y poseer esporas únicas. En un medio sólido forman colonias de bordes irregulares y aspecto rugoso; las colonias jóvenes presentan colores entre naranja y marrón (Figura 3), aunque también existen algunas cepas con colores verdosos (*M. olivasterospora*) o morados (*M. echinospora*); cuando los cultivos envejecen se vuelven mucosos y la mayoría de las colonias se oscurecen de forma notable (coincidiendo con la esporulación) hasta adquirir colores negros y marrones muy oscuros (13).

Su crecimiento óptimo oscila entre los 20-40°C, con pH básico y toleran la presencia de NaCl hasta el 3% (p/v). No pueden desarrollarse a 50°C, en medios con pH inferior a 6 y muestran poca probabilidad de crecimiento en medios por encima del 5% (p/v) de NaCl (13).



Figura 3. Típico crecimiento en medio sólido de las cepas *M. rosaria* (13).

Se han logrado aislar con frecuencia (cifras relativamente altas) de los suelos, en hábitats acuáticos como lagos, lodos y sedimentos fluviales; sin embargo, su presencia ha resultado en proporciones bajas comparada con el género *Streptomyces*. De la misma manera, diversos estudios han identificado a un gran número de cepas de *Micromonospora* mostrando una estrecha relación con diferentes grupos de plantas (13).

Es importante mencionar que *Micromonospora spp.* poseen un elevado potencial de producción de metabolitos secundarios, pues a partir de ellos se han obtenido importantes antibióticos (Tabla 2). Así mismo, han sido relevantes en el control biológico, debido a su capacidad para suprimir el crecimiento de hongos fitopatógenos como *Pythium spp.* y *Gaeumannomyces graminis var. tritici* (13).

Tabla 2. Ejemplos de algunos antibióticos y moléculas bioactivas obtenidas a partir de <i>Micromonospora spp.</i> (13).	
Antibiótico/Molécula aislada	Microorganismo productor
Gentamicina	<i>Micromonospora purpurea</i>
Sisomicina	<i>Micromonospora inyonensis</i>
Calicheamicina	<i>Micromonospora echinospora</i> subsp. <i>calichensis</i>
Dinemicina A	<i>Micromonospora chersina</i>
Lupinamicina	<i>Micromonospora lupin</i>
Retimicina	<i>Micromonospora sp.</i>
Galtamicina	<i>Micromonospora sp.</i>
Saquayamicina	<i>Micromonospora sp.</i>
Micinamicina	<i>Micromonospora sp.</i>
Everninomicina	<i>Micromonospora sp.</i>

○ ***Actinomadura***

Las especies de *Actinomadura* (Figura 4) se encuentran distribuidas en suelos, en ecosistemas marinos y en tejidos vegetales (43). Se caracterizan por ser bacterias no alcohol-ácido-resistentes que forman un micelio de substrato abundante y extenso (que no fragmenta) y un micelio aéreo que puede tener diversas formas (rectilínea, de gancho o espiralado), texturas (lisa, peluda o verrugosa) y colores (azul, marrón, crema, gris, verde, rosado, rojo, blanco o amarillo). Cuando el micelio aéreo se encuentra ausente, las colonias tienden a presentar una consistencia cartilaginosa o como de cuero (41).

El género es muy heterogéneo en su composición, a lo largo del tiempo ha sufrido diversas revisiones y reclasificaciones utilizando la taxonomía numérica, citoquímica y la sistemática molecular. Aunado a lo anterior, se sabe que de aproximadamente de 27 especies que existen, únicamente 3 tienen un valor clínico-patogénico para los humanos (41), destacando

A. madurae y *A. pelletieri* como responsables de actinomicetomas y lesiones graves que llegan hasta los tendones y huesos (5).

Por otro lado, la importancia de este género recae en su contribución al descubrimiento de fármacos, pues se le atribuye la producción de muchos tipos de metabolitos bioactivos como: el análogo de estaurosporina alcaloide, diterpenos, esteroles bendigoles, madurastatina C1, policétido nomimicina, β -carbolina, el ácido 3-oxiantranílico y la kistamicina A y B (43).

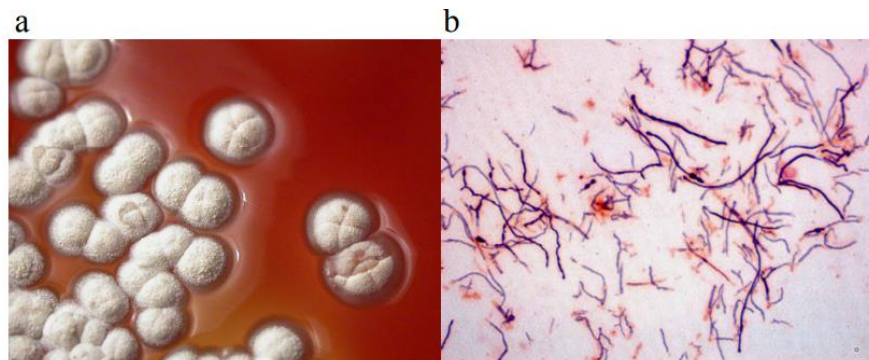


Figura 4. Colonias de *Actinomadura meyerae*. (a) Cultivo de *A. meyerae* en agar sangre. (b) Tinción de Gram de una colonia de *A. meyerae* (8).

○ ***Streptovercillium***

El género *Streptovercillium* es considerado un sinónimo del género *Streptomyces*, debido a que comparten muchas características entre sí. No obstante, es posible distinguirlos por los esporóforos verticilados de *Streptovercillium spp.* (34)

Las especies de este género presentan cadenas de esporas dispuestas en verticilos típicos a lo largo de hifas aéreas largas y rectas; el final de la cadena de esporas a veces parece un gancho o forma una o dos vueltas (Figura 5) (34)

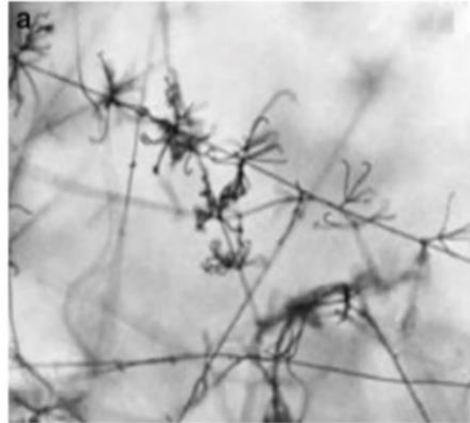


Figura 5. Morfología del micelio aéreo de *Streptoverticillium* spp. (34)

Es importante mencionar que, este género también tiene la capacidad de producir metabolitos bioactivos; por ejemplo, a partir de *Streptoverticillium* sp. se logró aislar una molécula con actividad inhibitoria frente a *Trichophyton mentagrophytes*, un hongo patogénico causante de la enfermedad del moho de las uñas en animales y humanos; de igual forma esta misma especie contribuyó al desarrollo de un antibiótico antitumoral (26).

- ***Actinoplanes***

Las cepas representantes del género son aerobias, mesófilas y saprófitas, se encuentran con abundancia en todo tipo de suelos marinos, fluviales y sedimentos lacustres, así como en agua marina y dulce (44). Las especies *Actinoplanes* (Figura 6) muestran una inmensa diversidad de color (21) y se distinguen de otros géneros de actinobacterias por su capacidad para producir órganos especiales portadores de esporas (esporangios) que contienen esporas móviles con flagelos polares, denominadas zoosporas (Figura 7) (44).



Figura 6. Colonias de *Actinoplanes sp.*, cultivadas en medio SFM (20).

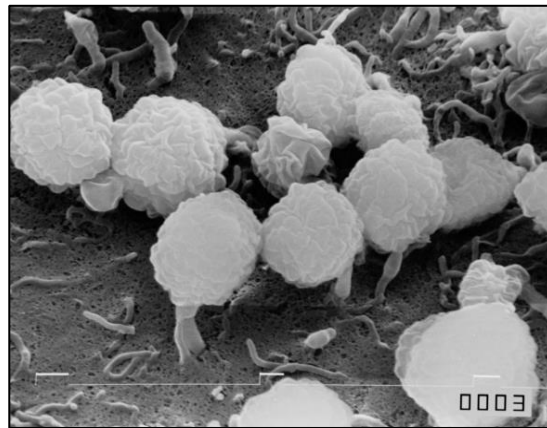


Figura 7. Micrografía electrónica de barrido de *A. missouriensis* 431^T. Intervalo de barra, 10 μm (50).

Por otra parte, el número de genomas secuenciados de este género se encuentra en constante crecimiento, debido a su capacidad de sintetizar metabolitos secundarios que funcionan como agentes antivirales, antibacterianos y antifúngicos (44). Particularmente, gran parte de su importancia radica en que su genoma contiene el grupo de genes encargado de producir acarbosa, utilizada para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II (49), y de ramoplanina A2, un potente agente antimicrobiano activo contra una amplia gama de bacterias Gram-positivas, incluyendo *Enterococcus sp.* resistente a la vancomicina (VRE), *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y *Clostridium difficile* con resistencia intermedia a la vancomicina (11).

- ***Nocardia***

Las especies del género *Nocardia* se encuentran abundantemente en el suelo y pueden tener forma de bacilos o de cocos. Sus colonias son calcáreas, irregulares y pueden presentar diferentes colores como marrón, rosa, naranja, rojo, púrpura, gris o blanco en medios de cultivo sólidos (Figura 8) (21). Así mismo, desprenden un olor característico a moho o tierra mojada (28).



Figura 8. Colonia de *Nocardia brasiliensis* en medio agar sangre y su tinción de Gram (28).

Son responsables de infecciones oportunistas en humanos, como la nocardiosis pulmonar y la enfermedad diseminada (ocasionadas por *N. asteroides*) que afectan principalmente a pacientes inmunosuprimidos, así como también la nocardiosis cutánea que se presenta como actinomicetomas o infecciones superficiales de la piel, siendo *N. brasiliensis* el agente etiológico de más del 80% de los casos (28). No obstante, además de su particular patogenia, *Nocardia spp.* también producen importantes moléculas bioactivas, como antibióticos y enzimas de interés biotecnológico (4).

- ***Saccharopolyspora***

Es posible encontrar a los miembros de este género en una amplia gama de hábitats, incluidos el suelo, sedimentos marinos, invertebrados marinos, plantas y muestras clínicas. Son microorganismos aerobios, Gram-positivos, con forma bacilar o cocoide. Se caracterizan por su capacidad de sintetizar metabolitos secundarios con enorme importancia médica, como los antibióticos macrólidos eritromicina A y espinosina A (38).

De igual manera, *Saccharopolyspora spp.* (Figura 9), representa una fuente prolífica de una gran variedad de metabolitos secundarios como macrólidos, alcaloides, quinonas, péptidos, oligosacáridos y glicolípidos, con diferentes efectos biológicos como insecticida, antimicrobiano, anticancerígeno, etc. (38).



Figura 9. Crecimiento de *S. taberi* en medio sólido (3).

○ ***Streptosporangium***

La mayoría de las especies de este género han sido aisladas de diferentes suelos, incluidos los desérticos y sedimentos de lagos (33). Morfológicamente forman un micelio de sustrato ramificado que no se fragmenta, así mismo, la punta de las hifas aéreas se muestra enrollada creando esporangios esféricos característicos que contienen esporas inmóviles (Figura 10) (16). Lo anterior distingue a este género de otros productores de vesículas de esporas, como *Actinoplanes*, *Ampullariella*, *Dactylosporangium*, *Planomonospora*, *Planobispora* y *Spirillospora*, ya que las esporas que éstos producen son móviles (33).

A pesar de que la mayoría de las especies han sido aisladas de suelos, también se han descrito varias especies endófitas como: *Streptosporangium oxazolinicum* que se encontró en la raíz de una orquídea, *Streptosporangium corydalis* que fue aislado de la raíz de *Corydalis yanhusuo* (hierba medicinal china también conocida como “cuerda bárbara oscura”), y *Streptosporangium taraxaci* encontrado en la raíz de diente de león (33).

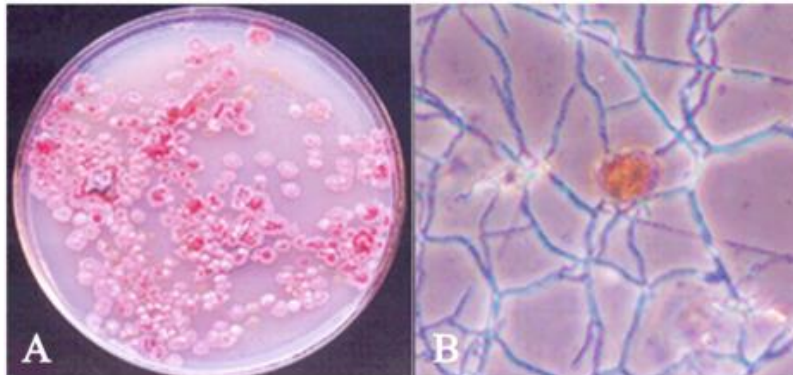


Figura 10. Cultivo de *Streptosporangium nondiastaticum* en medio ISP-4 por 14 días a 28°C. (a) Morfología de las colonias; (b) Microfotografía de contraste de fase mostrando hifas y esporangios (42).

Se sabe que los miembros del género *Streptosporangium* son responsables de la producción de metabolitos precursores de la síntesis de antibióticos como cloranfenicol, platomicina y dehidrosinafungina; así como también de una variedad enorme de moléculas bioactivas que han resultado de gran interés para la medicina y la biotecnología (33).

PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS

El proceso de identificación bacteriana tradicional se basa en primera instancia en las características observables de las bacterias, como su morfología, desarrollo y propiedades bioquímicas y metabólicas. Así mismo, durante dicho proceso resulta fundamental la experiencia del microbiólogo para la elección de una prueba o conjunto de pruebas cuyo propósito final sea la identificación del microorganismo a nivel de género y especie (9).

En el caso de las actinobacterias, particularmente para la identificación de las nocardias, se utilizan comúnmente pruebas de descomposición de sustratos específicos como adenina, xantina, caseína, hipoxantina, testosterona, tirosina y urea (46).

Por otra parte, en el mercado también existen sistemas o equipos multipuebas manuales o automatizados que facilitan la identificación de las bacterias permitiendo la realización de diversas pruebas de manera más rápida. Se trata de celdillas aisladas con sustrato liofilizado que se inoculan individualmente y permiten realizar simultáneamente entre 10 y 50 pruebas bioquímicas. Algunos ejemplos son: **API** (*bioMérieux*) (Figura 11), **Enterotube** (*BBL*), **Oxi/Ferm Tube** (*BD*), **RapIDsystemsyMicroID** (*Remel*), **BiochemicalIDsystems** (*Microgen*), entre otros. Sin embargo, todas exigen condiciones muy precisas de concentración del inóculo, inoculación, incubación y lectura, que si no se hacen de manera correcta pueden dar lugar a importantes errores (9).



Figura 11. Sistemas miniaturizados API® 20E, permite la identificación de microorganismos pertenecientes al grupo de las enterobacterias y de otros bacilos Gram-negativos (6).

USO DEL 16S rRNA COMO HERRAMIENTA FILOGENÉTICA Y TAXONÓMICA. TÉCNICAS UTILIZADAS.

Las técnicas de biología molecular han avanzado de manera significativa con el paso de los años, hecho que ha permitido analizar la diversidad microbiana a través del uso de métodos independientes de cultivo que brindan información más precisa acerca de los genomas bacterianos (12). Una de las metodologías más utilizadas para la identificación a nivel género-especie de las bacterias es la amplificación de fragmentos del gen 16S rRNA mediante PCR debido a que está presente en todas las bacterias y posee regiones variables las cuales son únicas en cada especie y funcionan como huellas dactilares que permiten diferenciarlas unas de otras (10) (35).

Se ha comprobado que los genes de RNA ribosomal son altamente conservados y evolutivamente estables, pero que contienen regiones hipervariables; lo anterior ha permitido que sean considerados como una herramienta idónea para la clasificación taxonómica (12).

El 16S rRNA es un polirribonucleótido codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S (47), tiene una secuencia aproximada de 1.550 pb de longitud y su análisis en diferentes grupos filogenéticos ha revelado la presencia *oligonucleótidos firma*, que son secuencias específicas cortas que aparecen en todos los miembros de un determinado grupo filogenético, y nunca se observan en otros grupos, incluidos los más próximos. Debido a lo anterior, el estudio del 16S rRNA ha funcionado como base para ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo y ha sido de gran ayuda para la construcción de librerías metagenómicas (32).

➤ **Extracción de DNA bacteriano**

Una parte muy importante en la identificación de alguna cepa desconocida es la extracción de los ácidos nucleicos a partir de la muestra de interés, para ello existen muchas técnicas que básicamente están fundamentadas en dos procedimientos: la extracción de ADN por tratamiento químico y el otro por lisis directa con métodos mecánicos. Cuando se implementan sustancias químicas el DNA obtenido resulta de mayor peso molecular que si se utilizan métodos mecánicos, sin embargo, con este último se recupera DNA de mayor diversidad microbiológica que con el primero. La selección del método de extracción es un paso fundamental en las técnicas moleculares y dependerá del organismo en el que se realiza el estudio, el tejido disponible y su estado de conservación (12).

Es muy importante que una vez realizada la extracción del material genético éste se mantenga en congelación y con las medidas adecuadas para evitar su posible degradación. (12).

➤ **Método molecular de identificación bacteriana**

El método para poder identificar una cepa bacteriana haciendo uso de la secuenciación del 16S rRNA consta de tres etapas: amplificación del gen, determinación del amplicón y análisis de su secuencia de nucleótidos (Figura 12) (32). La amplificación del rRNA 16S se realiza en un termociclador por medio de PCR utilizando DNA purificado como sustrato (proveniente de un cultivo puro del microorganismo o directamente de alguna muestra

clínica). Actualmente existen distintas bases de datos públicas como **GenBank NCBI** (*National Center for Biotechnology Information*), **EMBL** (*European Molecular Biology Laboratory*), **RDP** (*Ribosomal Database Project*), **RIDOM** (*Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms*), y otras privadas, como **MicroSeq** (*Applied Biosystems*) y **SmartGene IDNS** (*Integrated Database Network System*) (32).

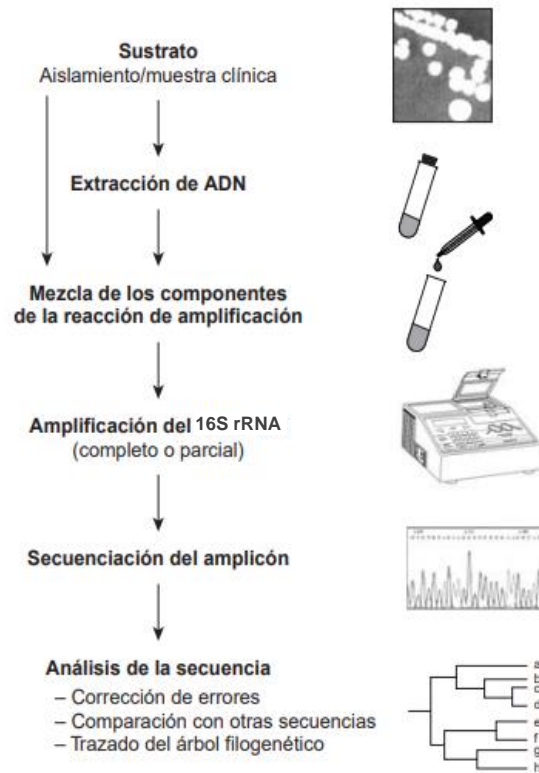


Figura 12. Etapas del proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del 16S rRNA (32).

➤ **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La técnica de PCR es una reacción enzimática *in vitro* llevada a cabo por la DNA polimerasa en la cual mediante una poderosa catálisis se realizan copias de una secuencia blanco de DNA (o ARN) con el objetivo de amplificar millones de veces un fragmento específico de dicho material genético para que pueda ser posteriormente analizado con diferentes fines (45).

Los termocicladores son los equipos designados para realizar PCR y están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo sean

las adecuadas para cada uno de los ciclos. Cada ciclo de PCR consta básicamente de tres etapas: desnaturalización, hibridación y extensión (Figura 13) (45).

1. *Desnaturalización.* Las cadenas de DNA son calentadas a 95°C para lograr la separación de las hebras. El tiempo suele ser de 20 a 30 segundos, sin embargo, éste dependerá de la cantidad de bases G-C y A-T (guanina-citosina; adenina-timina), ya que en el primer caso la unión estará formada por tres enlaces y en el segundo caso por dos enlaces, ocasionando que se necesite más tiempo para separar G-C (45).
2. *Hibridación.* En esta etapa, la temperatura adecuada debe estar entre 50-60°C, esto para que los primers se alineen al extremo 3' de las cadenas previamente separadas y se unan con su secuencia complementaria, formando el complejo cDNA-primers (45).
3. *Extensión.* Durante este paso la temperatura deberá estar a 72°C para que la enzima pueda ser funcional. Entonces, la Taq polimerasa reconocerá el complejo cDNA-primers y podrá comenzar con su función catalítica, agregando dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de DNA en dirección 5' a 3'. Al finalizar el ciclo, los productos formados tendrán un tamaño asignado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador (45).

Al finalizar la reacción, los productos de PCR (también llamados amplicones), deberán ser analizados por medio de electroforesis en gel de agarosa para corroborar si la reacción fue exitosa y se amplificó la secuencia blanco de interés (45).

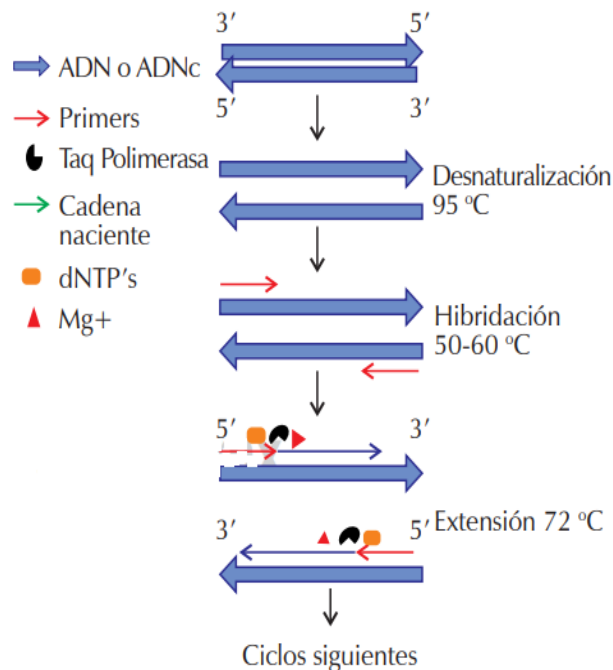


Figura 13. Etapas que conforman un ciclo en PCR (45).

➤ **Electroforesis en gel de agarosa para visualizar DNA**

El proceso de electroforesis consiste en el uso de una matriz sólida que funciona como filtro para separar a las moléculas de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica, utilizando un buffer o tampón que suele ser TAE (Tris-Acetato-EDTA) o TBE (Tris-Borato-EDTA) (45).

Cuando los amplicones son corridos en el gel, también se debe colocar un marcador de peso molecular que facilite la identificación de éstos respecto al tamaño (en pares de bases, pb) que se espera de ellos. Y para finalizar, la visualización de los amplicones se logrará exponiendo el gel a luz UV (45).

SISTEMAS BIOSINTÉTICOS PKS Y NRPS

Se conoce como sistemas biosintéticos al conjunto de genes que codifican a estructuras químicas que al unirse forman una molécula con probable actividad biológica (18). La producción de compuestos bioactivos en diversos microorganismos se debe particularmente a la presencia de los sistemas modulares policétido sintasa (PKS) y

sintetasa de péptido no ribosomal (NRPS) dentro de su genoma. Estos sistemas son multifuncionales, se sintetizan por grupos de genes codificados para un número variable de módulos (conformados por 1,000-1,500 aminoácidos) con diversas actividades enzimáticas y han sido encontrados en los phylum: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Cyanobacteria*, *Bacteroidetes*, *Sphingobacteria* y *Actinobacteria* (1).

Desde el descubrimiento de la estreptomicina, se han logrado identificar un gran número de antibióticos producidos por las Actinobacterias, incluidos agentes terapéuticos como: aminoglucósidos, cloranfenicol, tetraciclinas, macrólidos y cefamicina-lactama, que han sido aislados a partir de cultivos de *Streptomyces* y *Streptoverticillium* (portadores de los sistemas PKS y NRPS). La detección de estas regiones génicas dentro del ADN de los microorganismos contribuye a determinar si una cepa es potencialmente productora de compuestos con actividad farmacológica o de interés biotecnológico (1).

➤ Sistema PKS

Los productos que se generan por medio del PKS son sintetizados mediante la condensación-descarboxilación de ácidos carboxílicos por las policétido sintasas, utilizando acetato o propionato como sustrato.

Los módulos que conforman a este sistema básicamente están formados por cuatro dominios catalíticos (18):

1. Dominio acil-transferasa (AT), encargado de convertir al sustrato en malonil o metilmalonil-CoA para activarlo.
2. Dominio ACP (Proteína acarreadora de acilos), ayuda a iniciar la elongación de la cadena del policétido;
3. Dominio cetosintasa (KS), que descarboxila el malonil unido a ACP para que se condense con un tioéster de la cadena adjunta, generando como producto una unidad de acetato con un grupo β -ceto.
4. Dominio tioesterasa (Te), se encuentra al final de la cadena y tiene la tarea de liberar el producto como una macrolactona (18).

Así mismo, los tipos de PKS han sido clasificados en tres grupos dependiendo su secuencia, estructura primaria y su mecanismo catalítico (18). A continuación se muestran

algunas de las características de dicha clasificación y ejemplos de algunas moléculas bioactivas que han sido sintetizadas a partir de cada tipo de sistema (Tabla 3).

Tabla 3. Características de cada tipo de PKS y metabolitos secundarios derivados de cada sistema (1)(18).		
Tipo	Características	Metabolito secundario
PKS I	Se encarga de la síntesis de compuestos con actividad antibiótica, antiparasitaria, insecticida y antifúngica (1). En hongos, los dominios se pueden utilizar varias veces para sintetizar el policétido, mientras que en bacterias cada módulo se usa una sola vez (18).	- Anfotericina B (<i>Streptomyces nodosus</i>), - Avermectina (<i>Streptomyces avermitilis</i>), - Eritromicina (<i>Saccharopolyspora erythraea</i>) (18).
PKS II	Es el responsable de la producción de compuestos aromáticos bacterianos y fúngicos (18). En todos los casos, los dominios se utilizan de manera repetida para sintetizar un producto, y una característica importante de este sistema es la presencia de más dominios de composición (1).	- Daunorubicina (<i>Streptomyces sp</i>), - Tetraciclina (<i>Streptomyces rimosus</i>), - Pradimicina (<i>Actinomadura hibisca</i>) (18).
PKS III	Está presente en bacterias y hongos, no obstante se ha encontrado principalmente en las plantas. Por otro lado, las enzimas participantes en la biosíntesis de los metabolitos poseen mayor diversidad funcional (18).	- Chalcone (<i>Polygonum cuspidatum</i>), - Curcuminoides (<i>Curcuma longa</i>) (18).

➤ Sistema NRPS

Los sistemas de sintetasa de péptidos no ribosomales (NRPS) están compuestos por un grupo de genes que codifican para enzimas grandes y multimodulares organizadas en bloques o módulos (1). Cada módulo contiene aproximadamente 1,000-1,100 aminoácidos de largo y se conforma por dominios encargados de incorporar una unidad monomérica del péptido (18).

Básicamente son tres dominios catalíticos los necesarios para un completo ciclo de elongación en la síntesis de péptidos (1):

1. Dominio de adenilación (A), se encarga de reconocer a un aminoácido como sustrato y, mediante hidrolización del ATP, lo convierte en un aminoacil-adenilato para poder activarlo.
2. Dominio de la proteína transportadora peptidil (PCP) o Dominio de tiolación (T), contiene enlazado un cofactor de 4'fosfopanteteína (4'PP) el cual posee un residuo de serina que permite la unión entre el dominio PCP con el aminoácido activado por acción de la enzima 4'PP-transferasa.
3. Dominio de condensación (C), que forma el enlace entre un peptidil-S-PCP de un módulo con el peptidil-S-PCP del módulo siguiente a través de uniones C-N; es decir, cataliza la formación de enlaces del péptido.

Algunos sistemas bacterianos poseen un cuarto dominio, que se conoce como dominio de terminación tioesterasa (Te) y tiene la misma función que en los sistemas PKS: liberar el péptido biosintetizado mediante el rompimiento de las uniones tioéster del último módulo, dando una forma lineal, cíclica o ramificada al producto (18).

Adicionalmente, existen dominios auxiliares que con la participación de glicosiltransferasas, halogenasas y oxigenasas llevan a cabo modificaciones y sirven de apoyo para completar cada módulo. Algunos ejemplos son: el dominio de epimerización (E), el dominio de ciclización (Cy), el dominio de oxidación (Ox), y entre muchos otros que con el paso de los años diversos estudios han ido revelando (18).

Al igual que el sistema PKS, los NRPS tienen su propia clasificación basada en el tipo de biosíntesis que producen. En la siguiente tabla se observan algunas de las características

de cada NRPS y ejemplos de metabolitos secundarios sintetizados a partir de estos sistemas (Tabla 4) (18).

Tabla 4. Características de cada tipo de NRPS y ejemplos de metabolitos secundarios sintetizados a partir de ellos (1) (18).		
Tipo	Características	Metabolito secundario
NRPS I A lineal	La cadena del péptido resultante posee una secuencia de aminoácidos co-lineal con el número y orden de los módulos (1).	- Holomicina (<i>Streptomyces clavuligerus</i>) - Salinosporamida K (<i>Salinispora pacífica</i>)
NRPS II B iterativo	Tiene la capacidad de emplear los módulos o dominios repetidas veces para el ensamble de un solo producto. Estrategia generalmente utilizada para construir cadenas de péptidos con secuencias repetidas más pequeñas (1).	- Retimicina A (<i>Salinispora arenícola</i>) - Actinomicina (<i>Streptomyces spp.</i>) - Anfomicina (<i>Streptomyces canus</i>)
NRPS III C no lineal	Los productos resultan en moléculas peptídicas no lineales, debido a la inusual disposición de los módulos o dominios con dos diferencias principales: la ciclación interna inusual y el punto de ramificación de sintasa que conduce a una desviación de la función normal del NRPS lineal (1).	- Daptomicina (<i>Streptomyces roseosporus</i>) (18)

➤ **Importancia de la detección de sistemas biosintéticos en actinobacterias**

A lo largo del tiempo se han desarrollado nuevos métodos de biología molecular que han ayudado a identificar las vías de señalización en la biosíntesis de compuestos y a conocer un innumerable grupo de genes con el objetivo de mejorar la producción de compuestos de origen bacteriano. Así mismo, múltiples métodos de huella molecular han sido desarrollados a partir de secuencias de bacterias para lograr la correcta identificación filogenética de

microorganismos desconocidos en estudio. Aunado a lo anterior, la búsqueda utilizando la *Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)* de genes asociados al metabolismo secundario (sistemas PKS y NRPS), incluyendo la amplificación de secuencias específicas de genes ribosomales o el análisis y restricción de los productos de rDNA, son procedimientos frecuentemente utilizados para evaluar la capacidad de un microorganismo para sintetizar metabolitos bioactivos con alguna actividad farmacológica (1).

De acuerdo con un estudio realizado a más de veintitrés mil productos de origen microbiano con actividades antifúngicas, antibacterianas, antivirales, antitumorales, citotóxicas e inmunosupresoras, se observó que el 42% de las cepas responsables son hongos, el 32.1% corresponden al género *Streptomyces* y el 15.1% a otros géneros de actinobacterias, además de que el 10.6% restante también pertenece a estas últimas, pero aquellos que han sido poco estudiadas. De ahí surge la importante necesidad de continuar con el estudio de microorganismos y su identificación a través de tecnologías moleculares que permitan determinar si son potencialmente capaces de funcionar como productores de moléculas de interés médico, industrial, biotecnológico, y con muchas aplicaciones más (1).

METODOLOGÍA

Obtención de las muestras de tierra.

Se analizaron 13 muestras de tierra provenientes de suelo contaminado con hidrocarburos. Las muestras fueron tomadas en diferentes zonas y a distintas profundidades como se indica en la Tabla 5.

Tabla 5. Muestras de tierra utilizadas para el presente estudio.	
○ Superficie A	○ Tierra 1 profundidad 1.0 m
○ Superficie B	○ Tierra 1 profundidad 1.5 m
○ Superficie C (derrame de hidrocarburo)	○ Tierra 1 profundidad 2.5 m
○ Tierra 1 profundidad 0.0 m	○ Tierra 1 profundidad 3.0 m
○ Tierra 1 profundidad 0.25 m	○ Tierra 1 profundidad 3.5 m
○ Tierra 1 profundidad 0.5 m	○ Tierra 1 profundidad 4.5 m
	○ Tierra 1 profundidad 4.0 m

Aislamiento de cepas bacterianas ambientales

Las muestras de tierra fueron sembradas por triplicado en cajas Petri con medio de cultivo estéril Sabouraud (BD Bioxon), Bennett (extracto de levadura 1 g/L, extracto de carne 1 g/L, caseína digerida 2 g/L, glucosa 10 g/L y agar bacteriológico 15 g/L), agar nutritivo (Merck), agar de avena (avena gerber 60 g/L y agar bacteriológico 15g/L) y agar de malta (extracto de malta 10 g/L, glucosa 1 g/L, extracto de levadura 5 g/L, extracto de carne 2 g/L, peptona de caseína 4 g/L, triptona 1 g/L y agar bacteriológico 15 g/L) variando el % de sal (5, 10, 15%) y el pH (3, 5 y 7) utilizando el método de dispersión como se describe a continuación:

1. Se depositaron 10 g de tierra triturada en una bolsa Ziploc y se infló por completo.
2. Se pusieron los medios de cultivo dentro de un desecador.
3. Se colocó la tapa del desecador y se abrió la llave del vacío.
4. Después de unos segundos, se verificó que la tapa quedó bien sellada con el vacío.
5. Se agitó de arriba a abajo la bolsa Ziploc por 5 minutos.

6. Se abrió un poco la bolsa por una de sus esquinas de tal forma que solo se introdujo la llave de entrada del desecador.
7. Se abrió la llave del desecador (sin cerrar el vacío) y se esperó a que todo el aire del interior de la bolsa se transfiriera al interior del desecador.
8. Se retiró la bolsa, se cerró el vacío y se dejó abierta la llave del desecador para que éste se pudiera abrir.
9. Se retiró la tapa del desecador, se cerraron las cajas Petri y se repitieron los pasos partiendo del punto 5 cuantas veces fue necesario.

Los medios de cultivo fueron seleccionados con el objetivo de favorecer el crecimiento de *Streptomyces* sp. Se mantuvieron en incubación a 37°C por aproximadamente un mes.

Una vez desarrollado el crecimiento bacteriano en las cajas Petri, se seleccionaron colonias de posibles actinobacterias y otras eubacterias, se observaron en el microscopio y aquellas que presentaron morfología en forma de hifas, rodococos y algunos bacilos, fueron sembradas en los mismos medios de cultivo de los que provenían para su aislamiento, y en algunos casos, se añadió cicloheximida (1mL/100mL, estéril por filtración) a los medios para inhibir el crecimiento de hongos.

Se incorporó al estudio una bacteria halófila identificada con la clave "*A. mortiv*", proveniente del cepario del Laboratorio de Producción de Biológicos N-202 de la UAM Xochimilco, para su posterior análisis e identificación

Pruebas fenotípicas (19)

Se realizó el análisis fenotípico de las cepas de estudio considerando las características macroscópicas y microscópicas para la diferenciación entre especies.

- a) **Morfología macroscópica:** Se observaron las colonias en forma de "botón" considerando las características presentadas en la Tabla 6.

Tabla 6. Características macroscópicas consideradas para el análisis fenotípico.	
Tamaño	Pequeña (Peq) / Grande (Gra)
Forma	Circular (Circ) / Irregular (Irreg)
Borde	Entero (Ent) / Ondulado (Ond)
Transparencia	Opaca (Op) / Transparente (Trans)
Brillo	Sin brillo (SB) / Brillante (B)
Color	Pigmentada (Pigm) / No pigmentada (NP)
Textura	Lisa / Rugosa (Rug)
Elevación	Plana / Elevada (Elev)
Consistencia	Dura / Suave

- b) **Morfología microscópica:** Se analizó por medio de la tinción de Gram considerando características específicas observables a través de un microscopio (Tabla 7).

Tabla 7. Características microscópicas de la célula consideradas para el análisis fenotípico.	
Forma de la célula	Tipo de Gram
Cocos Rodococos Bacilos Hifas	Gram-positivas Gram-negativas

- c) **Pruebas bioquímicas:** Para todas las cepas aisladas se estudió su metabolismo a través de un análisis bioquímico realizando pruebas para la determinación de

descomposición de caseína, tirosina, urea y para la determinación de resistencia a la lisozima (40).

Preparación del medio para la determinación de descomposición de caseína.

1. Se disolvieron 10 g de leche descremada en polvo "Skim Milk" en 100 mL de agua destilada. Se esterilizó en autoclave a 121°C por 1 min.
2. Se disolvieron 2 g de agar bacteriológico en 100 mL de agua destilada. Se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 min.
3. La leche se mezcló con el agar y se distribuyó en cajas Petri. Los medios se dejaron gelificar y posteriormente fueron sometidos a prueba de esterilidad por 24 h.
4. Se inocularon los medios y fueron incubados a 37°C.
Se examinaron después de 7-14 días.
 - Prueba positiva: Se observó aclaramiento del medio alrededor y por debajo del crecimiento.

Preparación del medio para la determinación de descomposición de tirosina.

1. Se preparó agar nutritivo (peptona 5 g/L, extracto de carne 3 g/L y agar bacteriológico 15 g/L) y se verificó que su pH fuera 7.
2. Se disolvieron 0.5 g de tirosina en 10 mL de agua destilada (10 mL por cada 100 mL de agar nutriente).
3. Ambas preparaciones se esterizaron individualmente a 121°C por 15 min.
4. La tirosina se mezcló muy bien con el agar y dicha mezcla se vació en cajas Petri verificando que los cristales quedaran bien distribuidos en el medio. Se dejaron gelificar y fueron sometidos a prueba de esterilidad por 24 h.
5. Se inocularon los medios y fueron incubados a 37°C.
 - Prueba positiva: Se observó aclaramiento del medio alrededor y por debajo del crecimiento

Preparación del medio para la determinación de descomposición de urea.

1. Se disolvieron 3.87 g de caldo para pruebas de ureasa "BBL™ Urease Test Broth" (Becton Dickinson Microbiology Systems) en 100 mL de agua destilada.

2. La solución con urea se esterilizó por filtración y posteriormente se distribuyó en tubos de ensayo.
3. Los tubos fueron inoculados e incubados a 37°C. La prueba se leyó semanalmente hasta completar 4 semanas, utilizando un control negativo.
 - Prueba positiva: Se observó cambio de color en el medio.

Preparación del medio para la determinación de resistencia a la lisozima.

1. Se preparó caldo glicerol (peptona 5 g/L y glicerol 70 g/L), se distribuyó en tubos de ensayo y se esterizaron en autoclave a 121°C por 15 minutos.
2. Se disolvieron 100 mg de lisozima en 100 mL de una solución de HCl.
3. Por cada 95 mL de caldo glicerol estéril se agregaron 5 mL de lisozima esterilizada por filtración.
4. Se prepararon también tubos con medio control: caldo glicerol sin lisozima.
5. Se inocularon dos tubos por microorganismo (con lisozima y sin lisozima) y se incubaron a 37°C. Se observaron hasta después de 4 semanas.
 - Prueba positiva: Si hubo crecimiento en los dos tubos (tubo con lisozima y sin lisozima)
 - Prueba negativa: No hubo crecimiento o fue muy pobre en el medio con lisozima, pero si hubo crecimiento abundante en el tubo control.

Prueba de sensibilidad a antibióticos

Las actinobacterias aisladas fueron sembradas de forma masiva en el medio para su desarrollo (Bennett y MH). La caja Petri se dividió en cinco partes y se colocaron BD Sensi-Discs™ de los antibióticos: bacitracina (10 IU/IE/UI), ciprofloxacino (5 µg), nitrofurantoína (300 µg), estreptomina (10 µg) y vancomicina (30 µg). Las placas se incubaron a 37°C por 3 días y se realizó su lectura.

Prueba de actividad antimicrobiana (18).

La actividad antimicrobiana de las actinobacterias aisladas se evaluó contra cepas multirresistentes implementando el método de líneas cruzadas (Figura 14).

Las cepas multirresistentes que se utilizaron para la prueba fueron donadas por el “Hospital Materno Perinatal Mónica Pretelini” (Toluca de Lerdo, Méx.) y provenían de neonatos con sepsis. Las especies se muestran a continuación:

- FH858 *Klebsiella pneumoniae*
- FH1068 *Klebsiella pneumoniae* subsp *pneumoniae*
- FH1086 *Staphylococcus epidermidis*
- FH1088 *Acinetobacter baumannii*
- FH1233 *Klebsiella variicola*
- FH1403 *Staphylococcus saprophyticus*

En una caja Petri con medio de cultivo Bennett se sembró la actinobacteria de manera masiva formando una línea de extremo a extremo y se dejó en incubación a 37°C hasta observar el crecimiento total de la cepa (incluyendo el micelio aéreo). Posteriormente, se sembraron las bacterias multirresistentes de manera perpendicular comenzando casi al ras de la actinobacteria, tal y como se observa en la Figura 14.

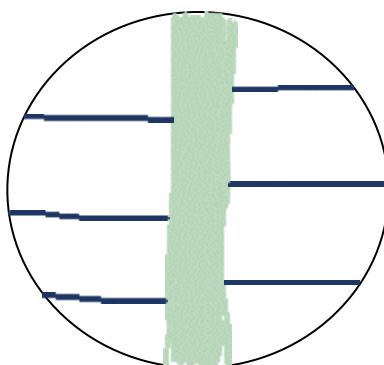


Figura 14. Técnica de líneas cruzadas para realizar la prueba de actividad antimicrobiana. ■ Actinobacteria ■ Cepas multirresistentes

El cultivo se mantuvo en incubación a 37°C y se analizaron los resultados a las 48 h. Así mismo, se sembraron las cepas multirresistentes en medio Bennett, con la finalidad de tener un control de su crecimiento en el medio utilizado.

Técnica de crioconservación para preservar las cepas

Los cultivos puros aislados de tierra se conservaron en microtubos para centrifuga estériles con medio de cultivo Bennett 80% agua y 20% glicerol, igualmente estéril. La técnica se realizó de la siguiente manera:

1. Se tomó gran cantidad de biomasa de un cultivo de la bacteria en placa y fue depositada en el criovial (en un ambiente estéril).
2. El tubo se etiquetó y se mantuvo en congelación a -20°C .

Extracción de DNA bacteriano

Las actinobacterias se sembraron en medio líquido Bennett y se incubaron a 110 rpm, 36.5°C , con el fin de facilitar la extracción de DNA.

Se realizó el procedimiento especificado por el fabricante utilizando el kit de Purificación de DNA Genómico Wizard® como se describe a continuación:

1. Las células se resuspendieron en un tubo con 480 μL de citrato de sodio 0.1 M
2. Se adicionaron 60 μL de lisozima (20 mg/mL) y se mezcló cuidadosamente.
3. La muestra se incubó a 37°C durante 1 hora.
4. Se centrifugó a 14 000 rpm por 5 min y se removió el sobrenadante.
5. Se agregaron 600 μL de solución de lisis nuclear del paquete de purificación y se mezcló cuidadosamente.
6. Se incubó el tubo a 80°C por 5 min en baño María y se dejó enfriar a temperatura ambiente.
7. Se adicionaron 3 μL de solución de RNAsa y se mezcló por inversión del tubo 3 veces.
8. Se incubó a 37°C por una hora y se dejó enfriar a temperatura ambiente.
9. Se añadieron 200 μL de solución de precipitación de proteínas y se agitó en vortex por 20 segundos.
10. Se incubó en hielo por 5 min.
11. Se centrifugó a 14 000 rpm por 3 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL con 600 μL de isopropanol.
12. Se mezcló suavemente hasta observar la formación de hebras de ADN.
13. El tubo se centrifugó a 14 000 rpm por 2 min y se drenó en papel absorbente.

14. Se adicionaron 600 μ L de etanol al 70% y el tubo se volteó varias veces teniendo cuidado de no despegar el pellet.
15. El tubo se centrifugó a 14 000 rpm por 2 min y se eliminó cuidadosamente el etanol. Se dejó secar por 10-15 minutos.
16. Se agregaron 100 μ L de solución rehidratante al tubo y se mantuvo en refrigeración (4°C) por 24 horas.

Amplificación del gen 23S como prueba de pureza (18).

Se realizó PCR para amplificar el inserto del gen 23S con el objetivo de comprobar la pureza de los cultivos de actinobacterias aisladas, considerando que en éstas dicho fragmento mide 350 pb y en cualquier otra bacteria mide 250 pb.

Se llevó a cabo la siguiente metodología:

1. Se colocaron 2.5 μ L de agua MiliQ estéril en un tubo para PCR estéril.
2. Se añadieron 2.5 μ L de Primer InsF (5'-MADGCGTAGNCGAWGG-3') (18)
3. Se añadieron 2.5 μ L de Primer InsR (5'-GTGWCGGTTNBGGTA-3') (18)
4. Se añadieron 12.5 μ L de Go Taq® G2 Green Master Mix.
5. Se añadieron 1 μ L de ADN extraído.

Las condiciones del ciclo térmico para la amplificación gen 23S fueron:

- Pre-desnaturalización por 5 minutos a 94°C.
- Desnaturalización por 30 segundos a 94°C.
- Alineamiento del primer por 20 segundos a 50°C.
- Amplificación por 40 segundos a 72°C.
- Elongación por 7 minutos a 72°C.
- 34 ciclos

Se analizaron los resultados realizando una electroforesis con gel de agarosa al 1.5%, utilizando como control positivo una actinobacteria pura y como control negativo un bacilo. El procedimiento se indica a continuación (19):

1. Se pesaron 450 mg de agarosa, se midieron 30 mL de TAE 1X y ambos se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 50 mL.

2. El matraz se agitó suavemente y se calentó en el horno de microondas por aproximadamente 40 segundos, hasta la disolución de todos los sólidos.
3. Se añadieron 3 μL de bromuro de etidio al matraz y se revolvió con cuidado.
4. Se armó la cámara de electroforesis horizontal y se agregó la mezcla con agarosa sobre el molde grande, el peine se colocó en la parte superior y se dejó solidificar la mezcla por aproximadamente 15 minutos.
5. El peine del molde se retiró con cuidado, el molde se colocó dentro de la cámara de electroforesis y posteriormente se agregó una solución TAE 1X hasta cubrir por completo el gel.
6. Se tomaron 5 μL de marcador de peso molecular de 100 pb y se mezclaron con 2 μL de buffer de carga. La mezcla se colocó cuidadosamente en uno de los pozos del gel.
7. Se tomaron 15 μL del producto de la PCR y se mezclaron con 2 μL de buffer de carga. La mezcla se colocó cuidadosamente en uno de los pozos del gel. Se repitió este procedimiento hasta colocar todas las muestras.
8. Se colocó la tapa de la cámara de electroforesis y se programó a 100 V por 20 minutos.
9. Una vez transcurrido el tiempo, el gel de agarosa se observó a través de luz UV.

Amplificación de los sistemas biosintéticos PKS-I y NRPS-I (18).

Para poder identificar la presencia de los sistemas biosintéticos en el genoma de las cepas aisladas y conocer si éstas son capaces de producir alguna molécula bioactiva, se realizó PCR siguiendo la metodología que se describe a continuación:

Para la amplificación del sistema NRPS-I.

1. Se añadieron 5.5 μL de agua MiliQ estéril en un tubo para PCR estéril.
2. Se añadieron 2 μL de Primer A7r (5'-SASGTCVCCSGTSCGGTAS-3') (2)
3. Se añadieron 2 μL de Primer A3f (5'-GCSTACSYSATSTACACSTCSGG-3') (2)
4. Se añadieron 12.5 μL de Go Taq® G2 Green Master Mix.
5. Se añadieron 3 μL de ADN extraído.

Las condiciones del ciclo térmico para la amplificación del sistema NRPS-I fueron:

- Pre-desnaturalización por 5 minutos a 95°C.

- Desnaturalización por 3 minutos a 95°C.
- Alineamiento del primer por 2 minutos a 55°C.
- Amplificación por 4 minutos a 72°C.
- Elongación por 10 minutos a 72°C.
- 35 ciclos.

Para la amplificación del sistema PKS-I.

1. Se añadieron 6 µL de agua MiliQ estéril en un tubo para PCR estéril.
2. Se añadieron 2 µL de Primer Kf1 (5'-TSAAGTCSAACATCGGBCA-3') (2)
3. Se añadieron 2 µL de Primer M6r (5'-CGCAGGTTSCSGTACCAGTAcit-3') (2)
4. Se añadieron 12 µL de Go Taq® G2 Green Master Mix.
5. Se añadieron 3 µL de ADN extraído.

Las condiciones del ciclo térmico para la amplificación del sistema PKS-I fueron:

- Pre-desnaturalización por 5 minutos a 95°C.
- Desnaturalización por 30 segundos a 95°C.
- Alineamiento del primer por 2 minutos a 58°C.
- Amplificación por 4 minutos a 72°C.
- Elongación por 7 minutos a 72°C.
- 34 ciclos.

Se analizaron los resultados realizando una electroforesis con gel de agarosa al 1.5%, siguiendo el mismo procedimiento que se utilizó para visualizar el gen 23S, pero en este caso con marcador de peso molecular de 1 Kb y colocando 10 µL del producto de PCR.

- Para el sistema NRPS-I el amplicón se observa entre 700-800 pb y para el sistema PKS-I entre 1100-1200 pb.

Identificación de las cepas por amplificación del gen 16S rRNA (19).

Para identificar a las bacterias aisladas y clasificarlas taxonómicamente, en primer lugar se amplificó el gen 16S rRNA, preparando la PCR de la siguiente manera:

1. Se añadieron 14.3 µL de agua MiliQ estéril en un tubo para PCR estéril.
2. Se añadieron 2.5 µL de 5x MyTaq Reaction Buffer.

3. Se añadieron 2.5 μ L de Primer 8f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') (19).
4. Se añadieron 2.5 μ L de Primer 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (19).
5. Se añadieron 0.2 μ L de MyTaq DNA Polymerase (BIO-21105 Meridian Biosciencie)
6. Se añadieron 3 μ L de ADN extraído.

Las condiciones del ciclo térmico para la amplificación del gen 16S rRNA fueron:

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

Se analizaron los fragmentos amplificados realizando una electroforesis con gel de agarosa al 1.5%, considerando que el amplicón del gen 16S rRNA se observa entre 1400-1500 pb.

- a) Dichos fragmentos fueron enviados al servicio de secuenciación MacroGen en Maryland, Estados Unidos
- b) Las secuencias obtenidas se analizaron y editaron con el programa BioEdit (Biological Sequences Alignment versión 7.7.1) (22)
- c) Utilizando las secuencias corregidas se generaron secuencias consenso las cuales fueron comparadas en las bases de datos: EzTaxon y GenBank BLAST del NCBI (39), y de esta forma fue realizada la identificación de las cepas.

Análisis filogenético con el uso de herramientas bioinformáticas (19).

La secuenciación de un genoma bacteriano es un registro explícito de los ancestros de dicha bacteria (27), considerando lo anterior, se realizó un análisis filogenético a las cepas de estudio para poder conocer su historia evolutiva.

1. Se obtuvieron secuencias del GenBank del NCBI correspondientes a los géneros y especies con las que las cepas a identificar presentaron los porcentajes más altos de semejanza. Se realizó un alineamiento múltiple a todas las secuencias con el programa BioEdit (Tabla 8).

Tabla 8. Ejemplo de alineamiento de secuencias.	
Organismo	Secuencia
Cepa 1	CGARTCGCCTGACTGARTCGG
Cepa 1	CGATTCGCCTGACTGAGTCGG

2. Se construyó el árbol filogenético por el método de máxima parsimonia con el programa MEGA (versión 11.0) (25). Este método tiene como objetivo la búsqueda e identificación de un posible árbol filogenético que requiera el menor número de eventos evolutivos
3. La estimación de la distancia de las ramas en el árbol se estima con el método de *Neighborjoining*, el cual está basado en que el mejor árbol es aquel que minimiza la longitud de las ramas internas. Para ello, a partir de un árbol en estrella, se determina la pareja de secuencias más cercanas y se unen mediante un nodo interno. Este proceso se repite con el resto de las secuencias hasta que quedan todas unidas por nodos internos que minimizan la longitud de cada una de las ramas internas, aunque no se asegura la longitud mínima global.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de cepas bacterianas ambientales

A partir de las 13 muestras de suelo contaminado que fueron analizadas se aislaron 11 cepas, de las cuales cinco presentaron morfología de actinobacterias y seis presentaron morfología de bacilos. La cepa “*A. mortiv*” presentó características de actinobacteria (Tabla 9).

Tabla 9. Claves de las cepas aisladas y utilizadas a lo largo del proyecto.	
Actinobacterias	Bacilos
<i>Azc4.5A</i>	<i>Azc4.5</i>
<i>Azc1.5-6A</i>	<i>Azc4.5B</i>
<i>Azc4.5C</i>	<i>Azc4.5E</i>
<i>Azc4.5D</i>	<i>Azc4.5G</i>
<i>Azc4.5F</i>	<i>AzcTS</i>
<i>A. mortiv</i>	<i>AzcTSC</i>

Pruebas fenotípicas

El crecimiento de las cepas de estudio osciló desde las 24-48 h hasta los 6 días, manteniéndolas en incubación a 37°C. El medio de cultivo preferido por todos los microorganismos fue Bennett, el cual para algunas bacterias debió adaptarse añadiendo 10% sal (Tabla 10) y a partir de su crecimiento en placa con este medio se analizó su morfología colonial observando las características macroscópicas y microscópicas particulares de cada cepa (Tablas 11 y 12).

La mayoría de las actinobacterias presentaron características similares desarrollando colonias grandes, circulares, sin brillo, ligeramente elevadas, de textura lisa, pigmentadas de color blanco y opacas (Tabla 11). De igual manera, todas se observaron como Gram-positivas con hifas que ramifican (Tabla 12) (Anexo A).

Por otro lado, los bacilos desarrollaron diferentes morfologías, en su mayoría presentaron colonias transparentes, brillantes, no pigmentadas y de textura suave, únicamente *AzcTS* se observó opaca y sin brillo (Tabla 11). Con relación a sus características microscópicas

se observó que todas las cepas eran bacilos largos Gram-positivos, no esporulados (Tabla 12). Así mismo, en la cepa Azc4.5 se logró apreciar una cápsula que rodeaba a todas las células (Anexo A).

Tabla 10. Cepas aisladas y características de crecimiento.			
Clave de la cepa	Medio de cultivo en el que se aisló	Medio de cultivo ideal	Tiempo de crecimiento
<i>Azc4.5A</i>	Sabouraud 5% sal	Bennett	- Crecimiento abundante 24 h - Micelio aéreo 48 h
<i>Azc1.5-6A</i>	Malta	Bennett	- Crecimiento abundante 24 h - Micelio aéreo 48 h
<i>Azc4.5C</i>	Bennett 10% sal	Bennett	- Crecimiento abundante 24 h - Micelio aéreo 72 h
<i>Azc4.5D</i>	Nutritivo 10% sal	Bennett	- Crecimiento abundante 24 h - Micelio aéreo 48 h
<i>Azc4.5F</i>	Nutritivo	Bennett	- Crecimiento abundante 24 h - Micelio aéreo 48 h
<i>A. mortiv</i>	Bennett 10% sal	Bennett 10% sal	- Ligeró crecimiento 4 días - Leve micelio aéreo 6 días
<i>Azc4.5</i>	Sabouraud pH 5	Bennett 10% sal	- Ligeró crecimiento 48 h
<i>Azc4.5B</i>	Bennett 10% sal	Bennett	- Ligeró crecimiento 48 h
<i>Azc4.5E</i>	Sabouraud 15% sal	Bennett 10% sal	- Ligeró crecimiento 48 h
<i>Azc4.5G</i>	Sabouraud 5% sal	Bennett 10% sal	- Ligeró crecimiento 48 h
<i>AzcTS</i>	Sabouraud pH 5	Bennett	- Crecimiento abundante 48 h
<i>AzcTSC</i>	Sabouraud 10% sal	Bennett 10% sal	- Crecimiento abundante 48 h

Tabla 11. Análisis fenotípico de las cepas aisladas. Características macroscópicas.

Clave de la cepa	Características morfológicas coloniales								
	Tamaño	Forma	Borde	Transparencia	Brillo	Color	Textura	Elevación	Consistencia
<i>Azc4.5A</i>	Peq	Circ	Ent	Op	SB	Pigm	Lisa	Elev	Dura
<i>Azc1.5-6A</i>	Gra	Circ	Ent	Op	SB	Pigm	Lisa	Elev	Dura
<i>Azc4.5C</i>	Gra	Circ	Ent	Op	SB	Pigm	Lisa	Elev	Dura
<i>Azc4.5D</i>	Gra	Circ	Ent	Op	SB	Pigm	Lisa	Elev	Dura
<i>Azc4.5F</i>	Gra	Circ	Ent	Op	SB	Pigm	Rug	Elev	Dura
<i>A. mortiv*</i>	Peq	Circ	Ent	Op	SB	Pigm	Rug	Elev	Dura
<i>Azc4.5*</i>	Gra	Irreg	Ond	Trans	B	NP	Lisa	Elev	Suave
<i>Azc4.5B</i>	Peq	Circ	Ent	Trans	B	NP	Lisa	Plana	Suave
<i>Azc4.5E*</i>	Peq	Circ	Ent	Trans	B	NP	Lisa	Plana	Suave
<i>Azc4.5G*</i>	Gra	Circ	Ent	Trans	B	NP	Lisa	Elev	Suave
<i>AzcTS</i>	Gra	Irreg	Ond	Op	SB	NP	Lisa	Plana	Suave
<i>AzcTSC*</i>	Peq	Irreg	Ond	Trans	B	NP	Lisa	Plana	Suave

(*) Las cepas marcadas con este símbolo se sembraron en medio Bennett 10% sal. Significado de las abreviaturas: Pequeña (Peq), Grande (Gra), Circular (Circ), Irregular (Irreg), Entero (Ent), Ondulado (Ond), Opaca (Op), Transparente (Trans), Sin brillo (SB), Brillante (B), Pigmentada (Pigm), No pigmentada (NP), Rugosa (Rug), Elevada (Elev).

Tabla 12. Análisis fenotípico de las cepas aisladas. Características microscópicas	
Clave de la cepa	Características microscópicas
<i>Azc4.5A</i>	Hifas, Gram-positiva
<i>Azc1.5-6A</i>	Hifas, Gram-positiva
<i>Azc4.5C</i>	Hifas, Gram-positiva
<i>Azc4.5D</i>	Hifas, Gram-positiva
<i>Azc4.5F</i>	Hifas, Gram-positiva
<i>A. mortiv</i>	Hifas, Gram-positiva
<i>Azc4.5</i>	Bacilos largos con cápsula, no esporulados, Gram-positivos
<i>Azc4.5B</i>	Bacilos largos, no esporulados, Gram-positivos
<i>Azc4.5E</i>	Bacilos largos, no esporulados, Gram-positivos
<i>Azc4.5G</i>	Bacilos largos, no esporulados, Gram-positivos
<i>AzcTS</i>	Bacilos largos, no esporulados, Gram-positivos
<i>AzcTSC</i>	Bacilos largos, no esporulados, Gram-positivos

Pruebas bioquímicas

Por otro lado, la realización de pruebas bioquímicas tradicionales permitió conocer algunas de las características metabólicas de las cepas de estudio. Se observó que la mayoría de las bacterias aisladas (con excepción de *A. mortiv*) poseen complejos enzimáticos que le permiten al microorganismo aprovechar la caseína; por otro lado, también se observó que en su totalidad presentan la ausencia de enzimas que metabolizan la tirosina (Tabla 13).

Todas las actinobacterias poseen la enzima encargada de descomponer la urea, caso contrario de los bacilos, pues ninguno logró el cambio de color en el medio. Por otro lado, respecto a la prueba de resistencia a la lisozima, se observó que ninguna de las cepas aisladas logró crecer en el medio con lisozima, por lo tanto, en todos los casos la prueba fue negativa (Tabla 13).

Tabla 13. Resultados de las pruebas bioquímicas.				
Clave de la cepa	Descomposición de caseína	Descomposición de tirosina	Descomposición de urea	Resistencia a la lisozima
<i>Azc4.5A</i>	+	-	+	-
<i>Azc1.5-6A</i>	+	-	+	-
<i>Azc4.5C</i>	+	-	+	-
<i>Azc4.5D</i>	+	-	+	-
<i>Azc4.5F</i>	+	-	+	-
<i>A. mortiv</i> *	-	-	+	-
<i>Azc4.5</i>	+	-	-	-
<i>Azc4.5B</i>	+	-	-	-
<i>Azc4.5E</i>	+	-	-	-
<i>Azc4.5G</i>	+	-	-	-
<i>AzcTS</i>	+	-	-	-
<i>AzcTSC</i>	+	-	-	-

(*) Se adaptó el medio para las pruebas bioquímicas añadiendo sal al 10%.

Prueba de sensibilidad a antibióticos

El 100% de las actinobacterias en estudio fueron sensibles al ciprofloxacino y a la vancomicina, así como también el 66% de las cepas presentó sensibilidad a la estreptomina; por otro lado, la furantoína solo inhibió el crecimiento de 2 cepas; y la bacitracina únicamente de 1 cepa (Tabla 14) (Figuras 15-20).

Tabla 14. Resultados del análisis de sensibilidad a antibióticos.					
Clave de la cepa	Antibiótico				
	Bacitracina	Ciprofloxacino	Nitrofurantoína	Estreptomina	Vancomicina
<i>Azc4.5A</i>	Resistente	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible
<i>Azc1.5-6A</i>	Resistente	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible
<i>Azc4.5C</i>	Resistente	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible
<i>Azc4.5D</i>	Resistente	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible
<i>Azc4.5F</i>	Resistente	Sensible	Sensible	Resistente	Sensible
<i>A. mortiv</i>	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente	Sensible

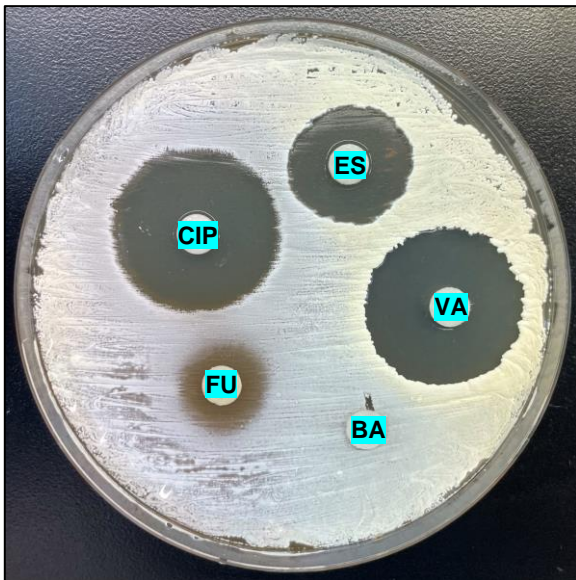


Figura 15. Antibiograma cepa Azc4.5A
 Estreptomicina (ES), Vancomicina (VA),
 Bacitracina (BA), Furantoína (FU),
 Ciprofloxacino (CIP).

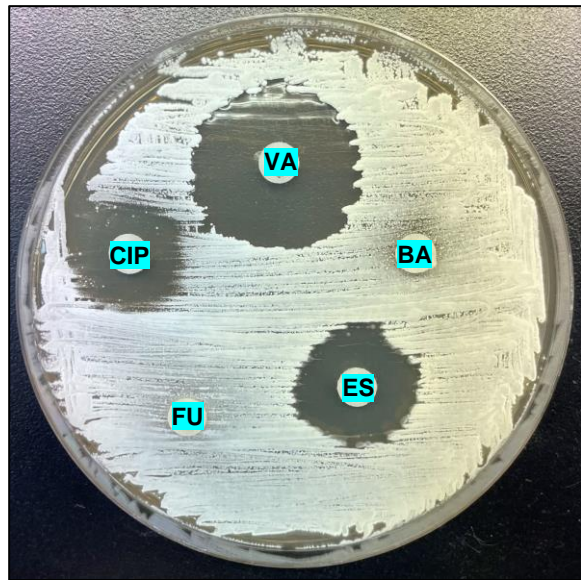


Figura 16. Antibiograma cepa Azc1.5-6A
 Estreptomicina (ES), Vancomicina (VA),
 Bacitracina (BA), Furantoína (FU),
 Ciprofloxacino (CIP).

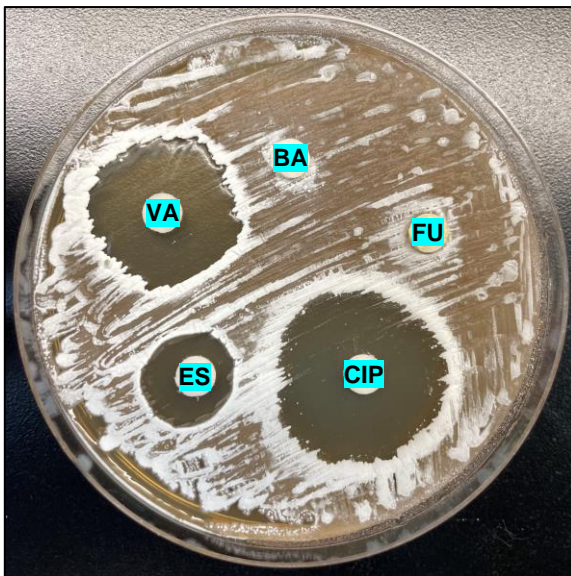


Figura 17. Antibiograma cepa Azc4.5C
 Estreptomicina (ES), Vancomicina (VA),
 Bacitracina (BA), Furantoína (FU),
 Ciprofloxacino (CIP).

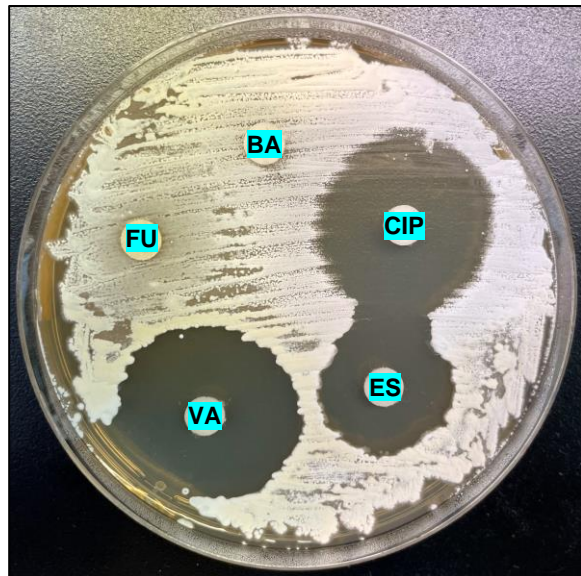


Figura 18. Antibiograma cepa Azc4.5D
 Estreptomicina (ES), Vancomicina (VA),
 Bacitracina (BA), Furantoína (FU),
 Ciprofloxacino (CIP).

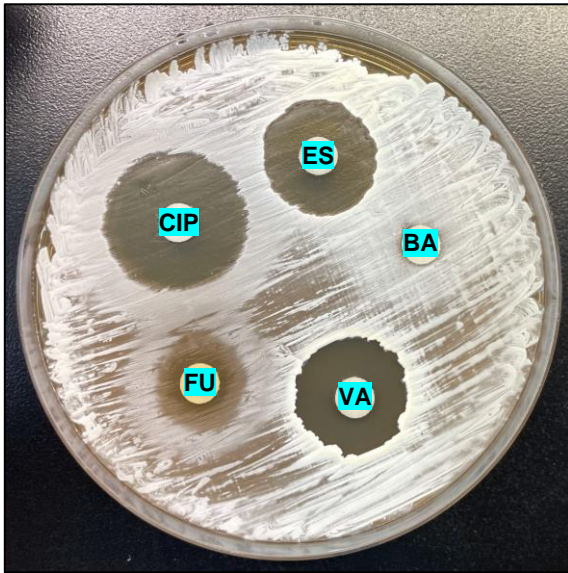


Figura 19. Antibiograma cepa *Azc4.5F* Estreptomicina (ES), Vancomicina (VA), Bacitracina (BA), Furantoína (FU), Ciprofloxacino (CIP).

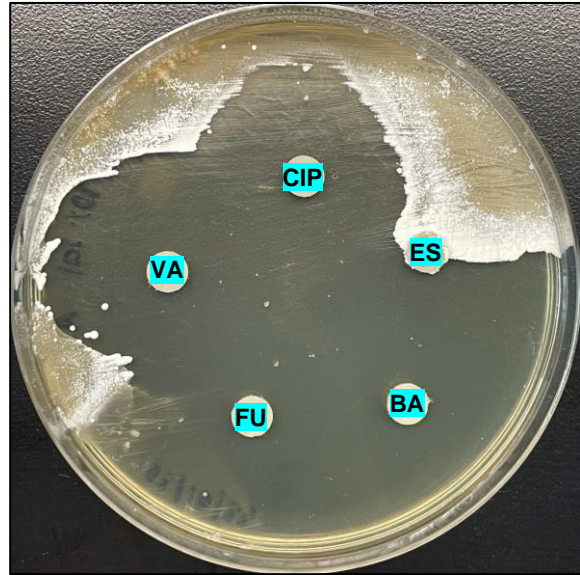


Figura 20. Antibiograma cepa *A. mortiv* Estreptomicina (ES), Vancomicina (VA), Bacitracina (BA), Furantoína (FU), Ciprofloxacino (CIP).

Prueba de actividad antimicrobiana

Se analizó el comportamiento de cepas multirresistentes provenientes de muestras clínicas al estar en contacto con las actinobacterias de estudio; se observó que las cepas *Azc1.5-6A* y *Azc4.5C* inhiben el crecimiento de las seis cepas multirresistentes sembradas, *Azc4.5A* y *Azc4.5D* también inhiben el desarrollo bacteriano de cinco cepas multirresistentes y cuatro de ellas, respectivamente (Tabla 15) (Figura 21).

Tabla 15. Resultados del análisis de actividad antimicrobiana.						
Clave de la cepa	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i> subs <i>pneumoniae</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>K. variicola</i>	<i>S. saprophyticus</i>
<i>Azc4.5A</i>	Crece	Inhibe	Inhibe	Inhibe	Inhibe	Inhibe
<i>Azc1.5-6A</i>	Inhibe	Inhibe	Inhibe	Inhibe	Inhibe	Inhibe
<i>Azc4.5C</i>	Inhibe	Inhibe	Inhibe	Inhibe	Inhibe	Inhibe
<i>Azc4.5D</i>	Crece	Inhibe	Inhibe	Inhibe	Crece	Inhibe
<i>Azc4.5F</i>	Crece	Crece	Crece	Crece	Crece	Crece
<i>A. mortiv</i> *	-	-	-	-	-	-

(*) Medio Bennett 10% sal

El análisis de la actividad antimicrobiana de la cepa *A. mortiv* se realizó en medio Bennett 10% sal debido a que es una bacteria halófila, sin embargo, las cepas multirresistentes presentaron crecimiento muy pobre debido a la presencia de sal en el medio. A partir de lo anterior puede decirse que *A. mortiv* no inhibió el crecimiento de las bacterias multirresistentes, no obstante, el crecimiento de estas últimas no fue el normal observado en medio Bennett, por lo que la prueba no se considera confiable y se recomienda utilizar otro método para analizar la actividad antimicrobiana de cepas halófilas.

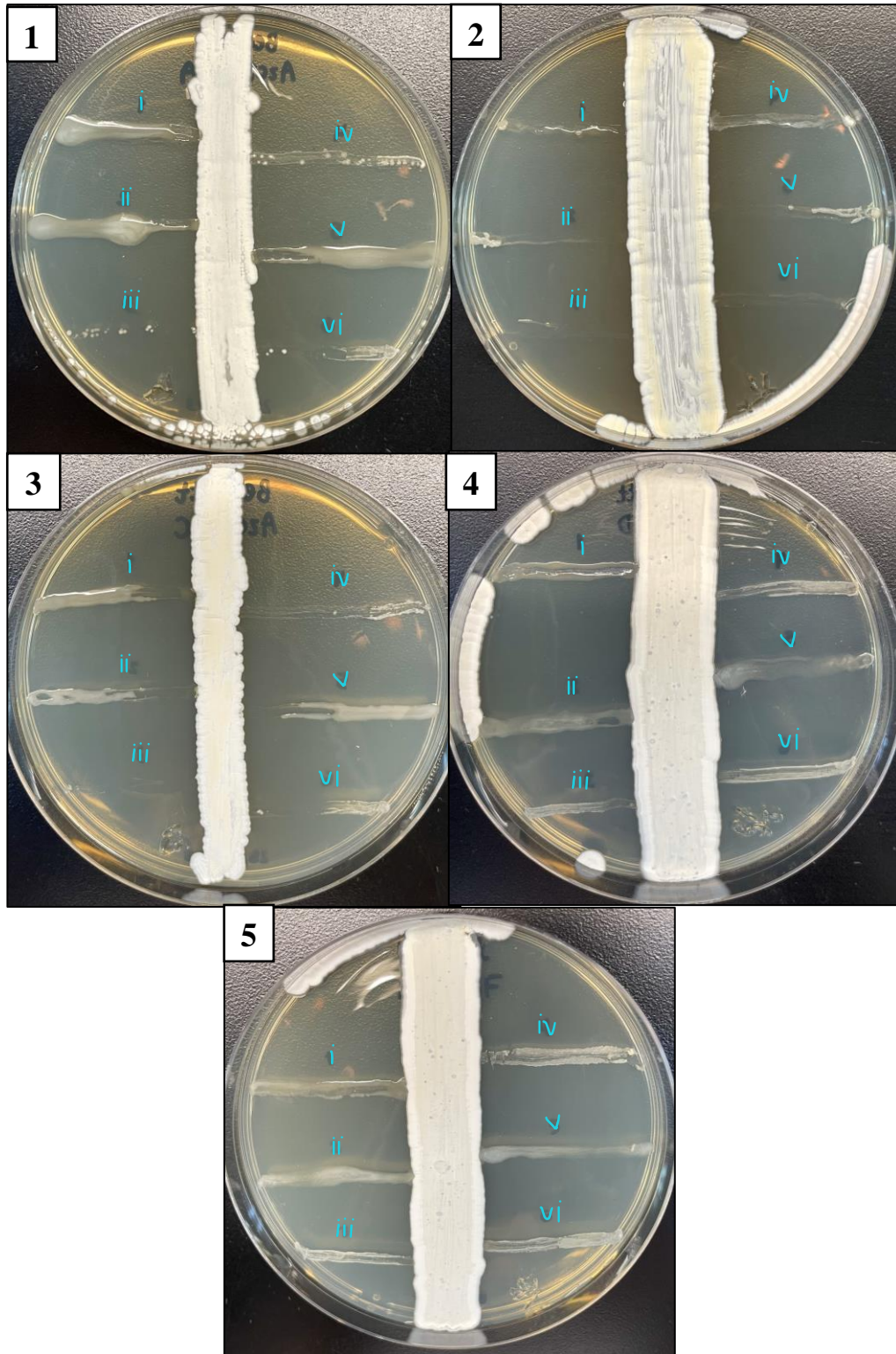


Figura 21. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las cepas: (1) *Azc4.5A*, (2) *Azc1.5-6A*, (3) *Azc4.5C*, (4) *Azc4.5D* y (5) *Azc4.5F*. Las cepas multirresistentes corresponden a: (i) *K. pneumoniae*, (ii) *K. pneumoniae* subs. *pneumoniae*, (iii) *S. epidermidis*, (iv) *A. baumannii*, (v) *K. variicola* y (vi) *S. saprophyticus*.

Extracción de DNA bacteriano

La extracción del DNA de cada una de las cepas se realizó de manera satisfactoria siguiendo la metodología designada y se verificó que hubiera suficiente DNA realizando una electroforesis, si se observaba una banda era suficiente para realizar las siguientes pruebas de pureza y de identificación.

Amplificación del gen 23S como prueba de pureza

Se utilizó el DNA extraído para comprobar la pureza de los cultivos de actinobacterias y de igual forma, se realizó una electroforesis para verificar los resultados de la prueba realizada.

En la Figura 22 se observa un ejemplo del gel de agarosa con los amplicones del gen 23S. Las cepas *Azc4.5A*, *Azc4.5F* y *A. mortiv* pasaron la prueba de pureza al presentar una sola banda en 350 pb; por otro lado, la cepa *Azc4.5D* (D) exhibió dos bandas, una en 250 pb y otra en 350 pb, lo que indica la presencia de dos bacterias en el cultivo, por lo que debió sembrarse por estría cruzada para lograr su purificación y se le repitió la prueba en conjunto con aquellas cepas a las que aún no se le realizaba.

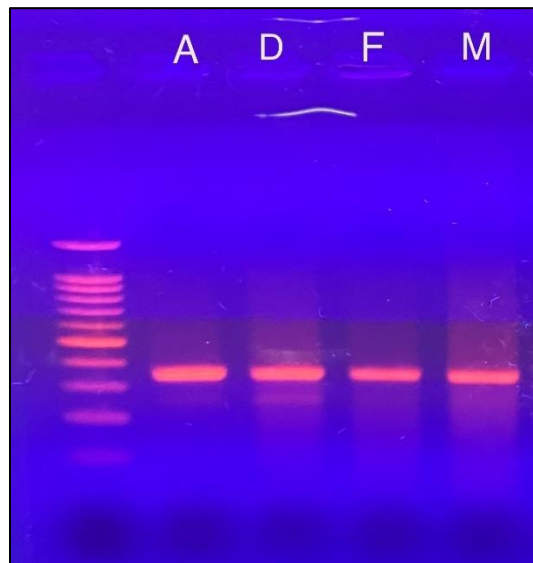


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa que permite la visualización de los amplicones del gen 23S para comprobar la pureza de los cultivos en estudio. Las cepas observadas son: (A) *Azc4.5A*, (D) *Azc4.5D*, (F) *Azc4.5F* y (M) *A. mortiv*.

Amplificación de los sistemas biosintéticos PKS-I y NRPS-I

Después de realizar la PCR de manera independiente para amplificar cada uno de los sistemas en las cepas de estudio (actinobacterias y bacilos), se observó que el 100% de ellas poseen el sistema NRPS-I y solo el 41% posee el sistema PKS-I (Tabla 16).

Tabla 16. Resultados de la amplificación de los sistemas biosintéticos.		
Clave de la cepa	NRPS-I	PKS-I
<i>Azc4.5A</i>	Sí	Sí
<i>Azc1.5-6A</i>	Sí	Sí
<i>Azc4.5C</i>	Sí	Sí
<i>Azc4.5D</i>	Sí	Sí
<i>Azc4.5F</i>	Sí	Sí
<i>A. mortiv*</i>	Sí	No
<i>Azc4.5</i>	Sí	No
<i>Azc4.5B</i>	Sí	No
<i>Azc4.5E</i>	Sí	No
<i>Azc4.5G</i>	Sí	No
<i>AzcTS</i>	Sí	No
<i>AzcTSC</i>	Sí	No

Los resultados se observan en la Figura 23 que presenta los amplicones del sistema NRPS-I entre 700-800 pb; así como también en la Figura 24 que presenta los del sistema PKS-I con bandas entre 1100-1200 pb.

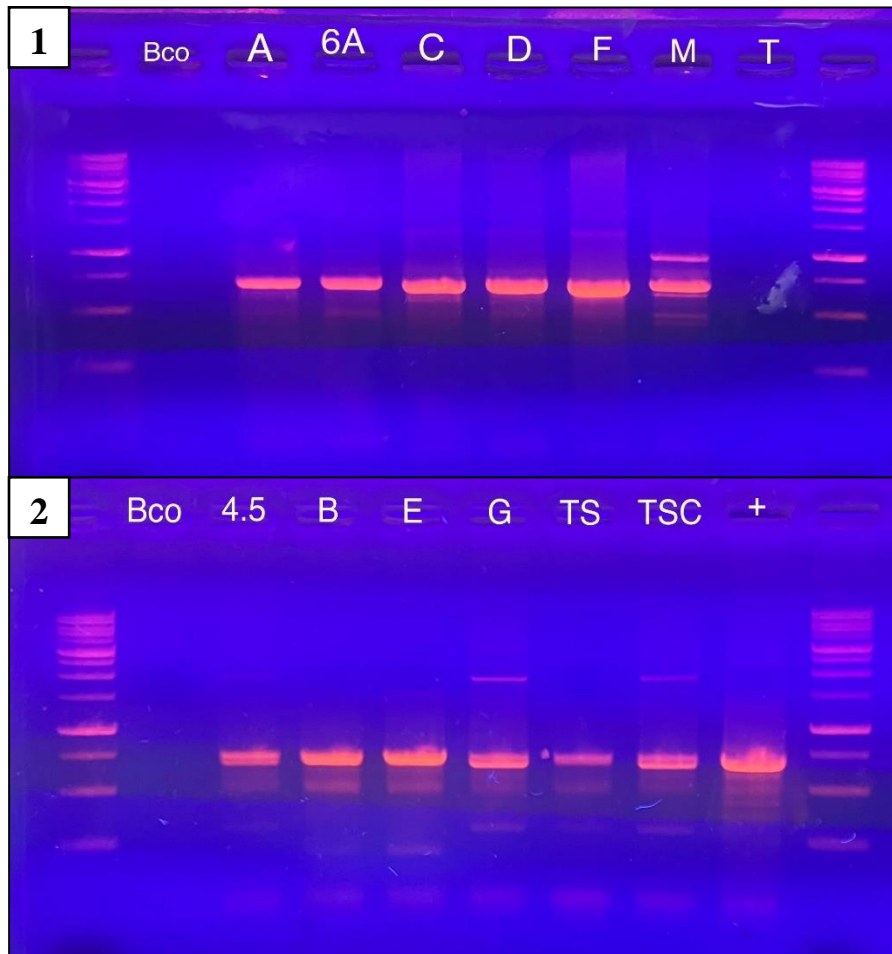


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa que permite visualizar los resultados de la amplificación del sistema NRPS-I de actinobacterias (1) y bacilos (2) en estudio. Las cepas observadas son: (A) *Azc4.5A*, (6A) *Azc1.5-6A*, (C) *Azc4.5C*, (D) *Azc4.5D*, (F) *Azc4.5F*, (M) *A. mortiv*, (4.5) *Azc4.5*, (B) *Azc4.5B*, (E) *Azc4.5E*, (G) *Azc4.5G*, (TS) *AzcTS* y (TSC) *AzcTSC*.

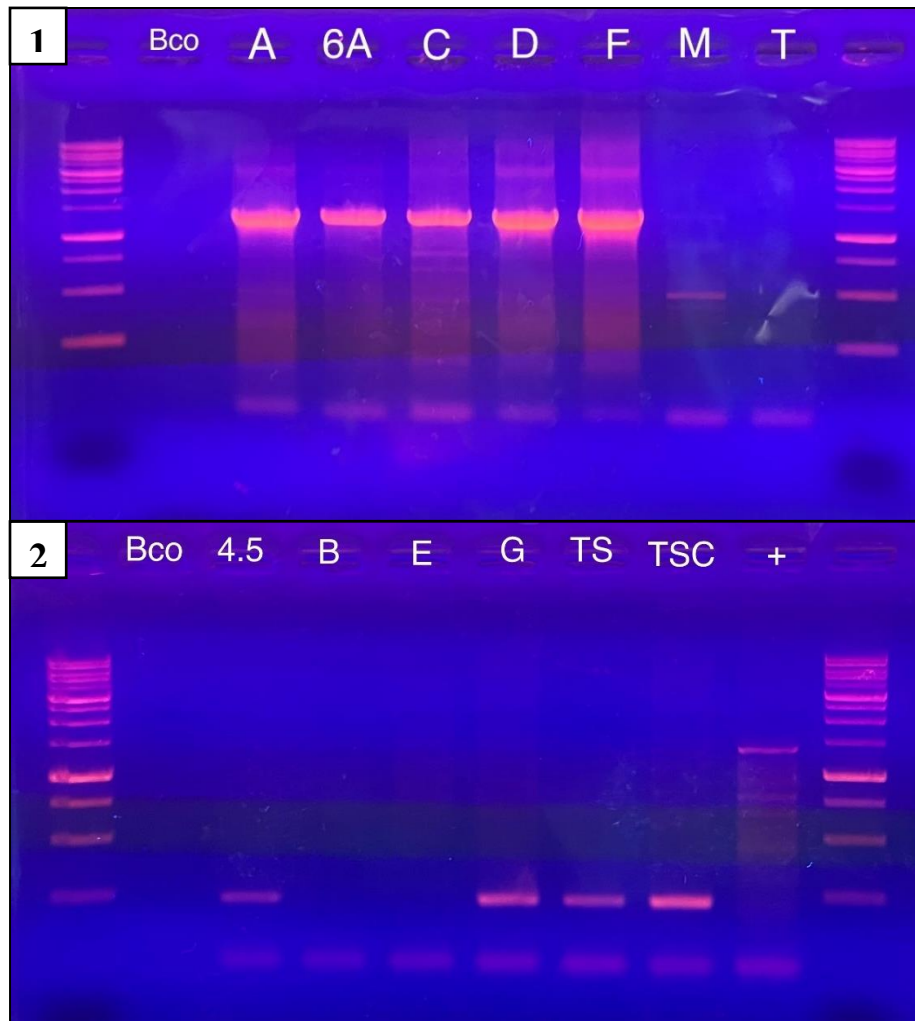


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa que permite visualizar los resultados de la amplificación del sistema PKS-I de actinobacterias (1) y bacilos (2) en estudio. Las cepas observadas son: (A) *Azc4.5A*, (6A) *Azc1.5-6A*, (C) *Azc4.5C*, (D) *Azc4.5D*, (F) *Azc4.5F*, (M) *A. mortiv*, (4.5) *Azc4.5*, (B) *Azc4.5B*, (E) *Azc4.5E*, (G) *Azc4.5G*, (TS) *AzcTS* y (TSC) *AzcTSC*.

Identificación de las cepas por amplificación del gen 16S rRNA

Se realizó la amplificación del gen 16S a todas las actinobacterias aisladas y a dos bacilos que presentaron una morfología colonial diferente a las demás cepas; los fragmentos fueron secuenciados por MacroGen en Estados Unidos y posteriormente se editaron con el programa BioEdit (versión 7.7.1).

Una vez que se realizó la corrección de secuencias, éstas se analizaron en las bases de datos: BLAST del NCBI y EZBioCloud, dando como resultado que, el 100% de las actinobacterias aisladas de las muestras de tierra son *Streptomyces albus*, y la cepa que fue proporcionada por el laboratorio para su estudio e identificación corresponde al género *Actinopolyspora*. Así mismo, los dos bacilos analizados fueron identificados como *Bacillus tequilensis* y *Bacillus subtilis* (Tabla 17).

Tabla 17. Identificación de las cepas por el gen 16S con secuencias de nucleótidos corregidas.			
Clave de la cepa	Identidad	Similitud (%)	Base de datos consultada
<i>Azc4.5A</i>	<i>Streptomyces albus</i> DSM 40763	87.47%	NCBI BLAST
<i>Azc1.5-6A</i>	<i>Streptomyces albus</i> DSM 40763	78.85%	NCBI BLAST
<i>Azc4.5C</i>	<i>Streptomyces albus</i> DSM 40763	98.65%	NCBI BLAST
<i>Azc4.5D</i>	<i>Streptomyces albus</i> DSM 40763	81.47%	NCBI BLAST
<i>Azc4.5F</i>	<i>Streptomyces albus</i> NBRC 13014	93.16%	EZBioCloud
<i>A. mortiv</i>	<i>Actinopolyspora dayingensis</i> TRM4064	91.33%	EZBioCloud
<i>Azc4.5</i>	<i>Bacillus tequilensis</i> KCTC 13622	94.54%	EZBioCloud
<i>AzcTS</i>	<i>Bacillus subtilis</i> NCIB 3610	97.95%	EZBioCloud

Análisis filogenético con el uso de herramientas bioinformáticas

Utilizando la aplicación MEGA (versión 11.0) se realizó el árbol filogenético de las cepas de estudio con las secuencias previamente corregidas y alineadas en BioEdit (versión 7.7.1)

En la Figura 25 se observa que las cepas de estudio se acomodaron en tres grupos, en el primero, integrado por *Azc4.5C*, *Azc4.5F* y *A. mortiv*, se observa que *A. mortiv* es diferente de las dos primeras pues corresponde al género *Actinopolyspora*. El segundo grupo que contiene a las cepas: *Azc4.5* y *AzcTS*, se observa apartado de los otros dos, pues corresponden al género *Bacillus*. Por último, en el tercer grupo se observan *Azc4.5A*, *Azc1.5-6A* y *Azc4.5D*, que a pesar de ser del mismo género (*Streptomyces*), *Azc4.5A* resulta ser diferente de las otras dos.

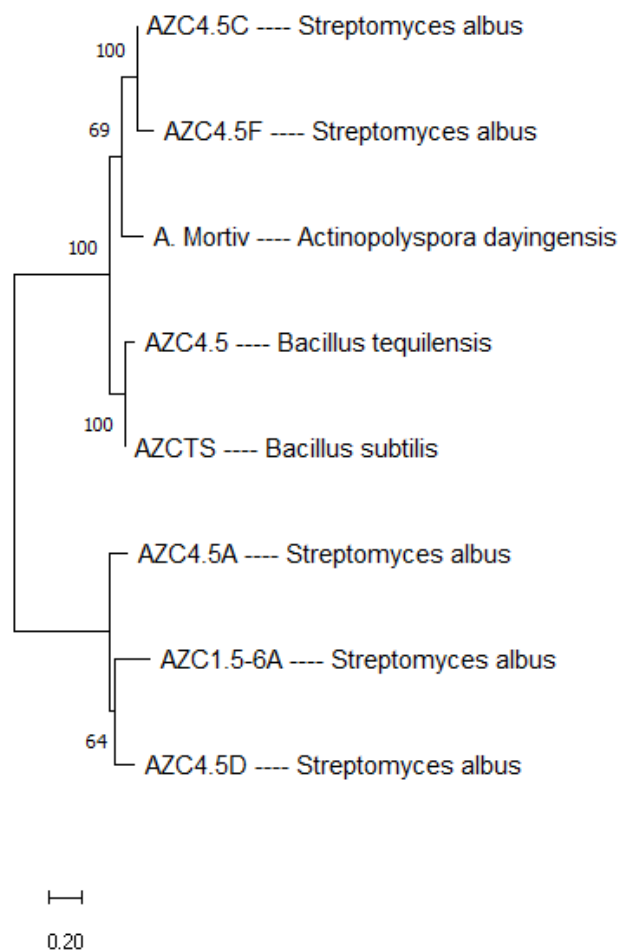


Figura 25. Árbol filogenético de las cepas de estudio.

CONCLUSIONES

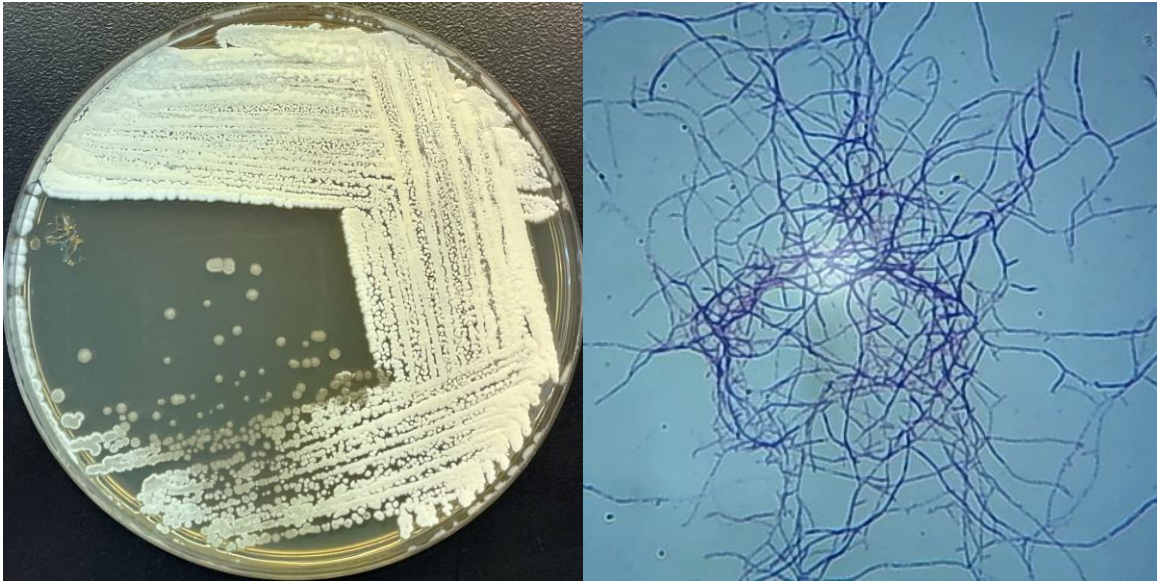
Al realizar aislamiento bacteriano a partir de 13 muestras de tierra provenientes de suelo contaminado con hidrocarburos se aislaron 11 microorganismos en medio Bennett, de los cuales 5 fueron actinobacterias y 6 eubacterias. Por otro lado, mediante un análisis fenotípico, pruebas bioquímicas, análisis de su actividad antimicrobiana y pruebas de sensibilidad a antibióticos se caracterizaron todas las cepas de estudio, incluyendo una cepa halófila proporcionada por el laboratorio (*A. mortiv*) con características morfológicas de actinobacteria. Se extrajo el DNA de todas las cepas, lo que a su vez permitió el análisis de su genoma al amplificar el gen 23S como prueba de pureza, la amplificación de los sistemas biosintéticos y la identificación por medio del gen 16S.

Se identificó que el 100% de las actinobacterias aisladas corresponden al género *Streptomyces*, demostrando así que dicho género es el más abundante dentro de las actinobacterias de suelo (30). Por otro lado, la cepa *A. Mortiv* fue identificada como *Actinopolyspora dayingensis*, *AzcTS* como *Bacillus subtilis* y *Azc4.5* como *Bacillus tequilensis*. Adicionalmente, fue posible analizar la similitud evolutiva entre dichas especies a través de un árbol filogenético (Figura 25).

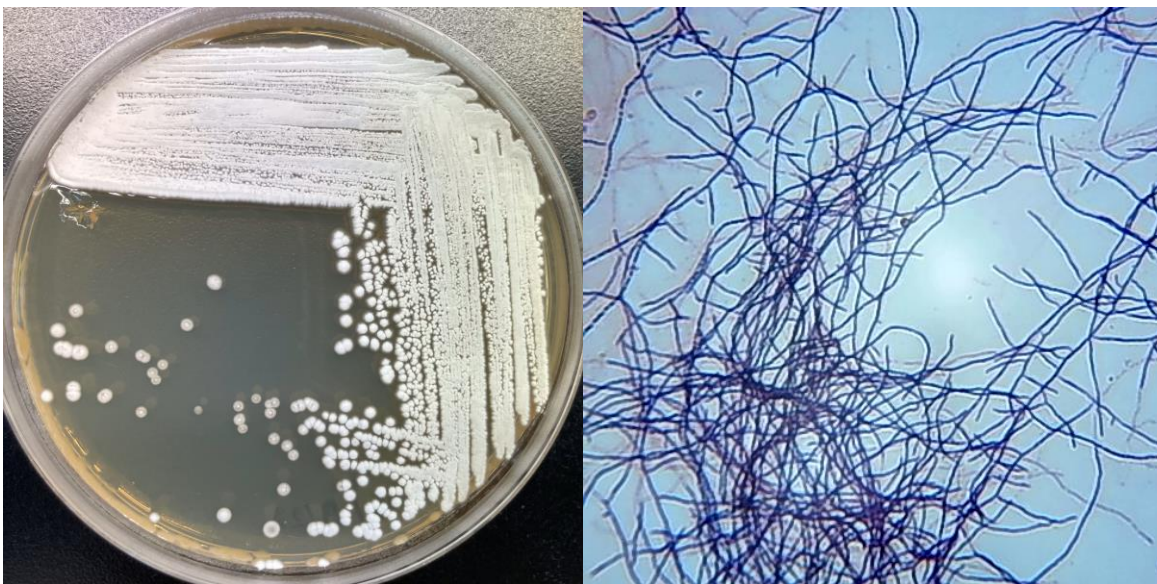
Al amplificar los sistemas biosintéticos se observó que la mayoría de las actinobacterias (5 cepas) (*Streptomyces albus*) presentaron el sistema PKS-I, la única que no lo presentó fue la cepa *A. Mortiv* (*Actinopolyspora dayingensis*). Al analizar la actividad antimicrobiana de las actinobacterias, fue posible observar que casi en todos los casos se apreciaba una inhibición en el crecimiento de algunas cepas multirresistentes, excepto con *A. Mortiv*. La explicación del por qué no generó efecto alguno en el crecimiento de dichas cepas, podría deberse a que es la única actinobacteria dentro del estudio que no presentó el sistema PKS-I, el cual se encarga de la síntesis de compuestos con actividad antibiótica, antiparasitaria, insecticida y antifúngica (1), además de que no corresponde al género *Streptomyces* como las demás, ya que las especies de *Streptomyces* se conocen en la actualidad como las principales productoras de metabolitos secundarios con múltiples aplicaciones en agricultura, biotecnología y medicina (14). Sin embargo, como se mencionó, la técnica empleada para la prueba de actividad antimicrobiana no es precisa para bacterias con nutrición especial, como el caso de halófilas, ya que la inhibición de las bacterias multirresistentes también podría deberse a la cantidad de sal empleada en el medio de cultivo para el crecimiento de la actinobacteria.

ANEXOS

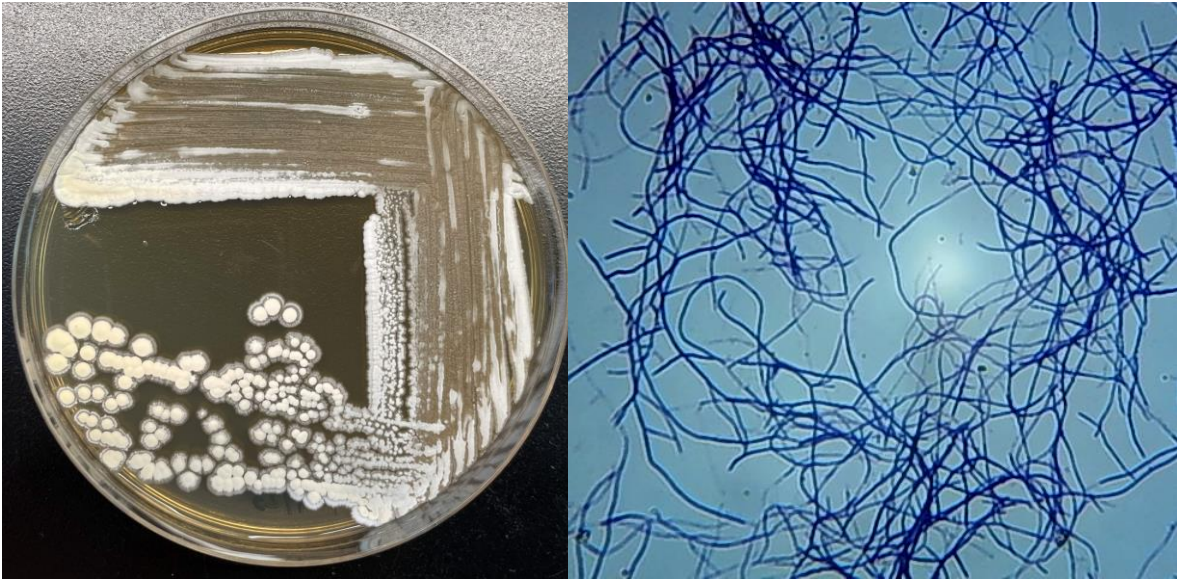
Anexo A. Imágenes macroscópicas y microscópicas de las cepas de estudio.



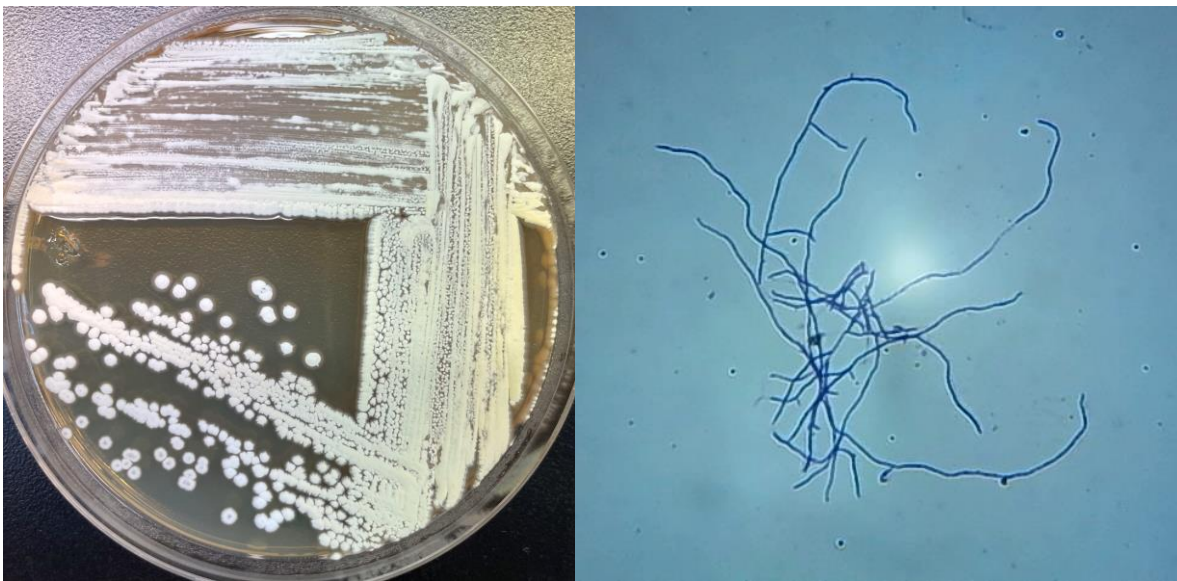
Azc4.5A



Azc1.5-6A



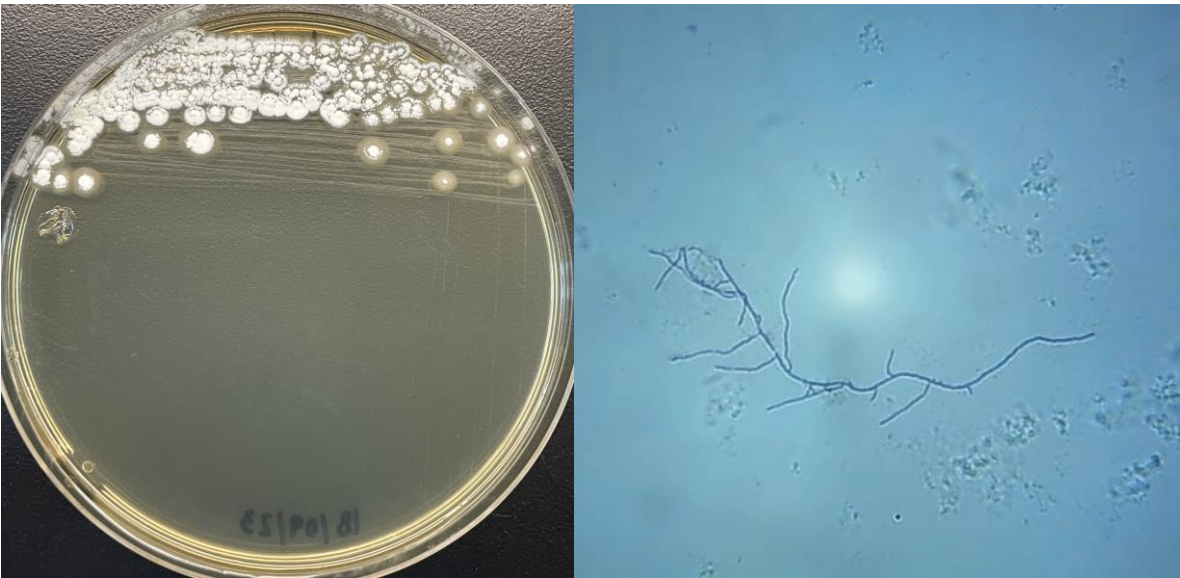
Azc4.5C



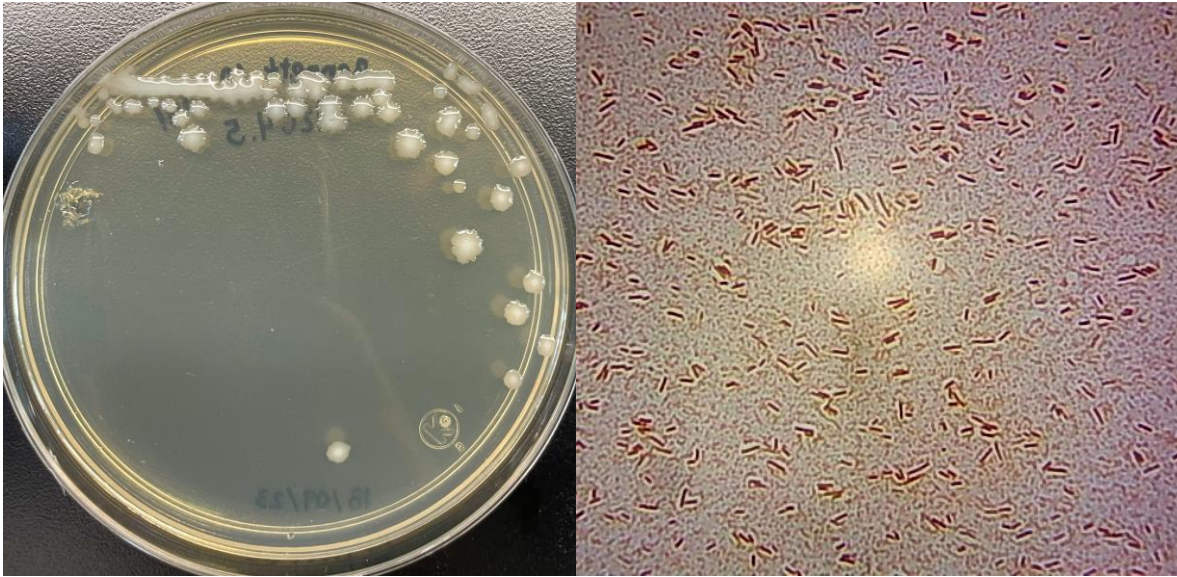
Azc4.5D



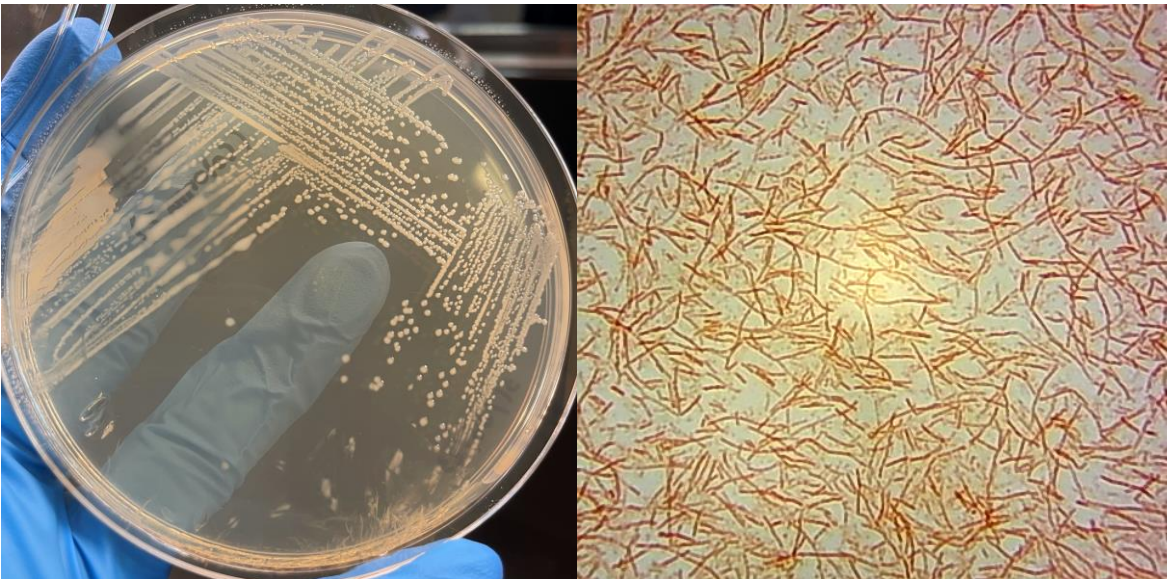
Azc4.5F



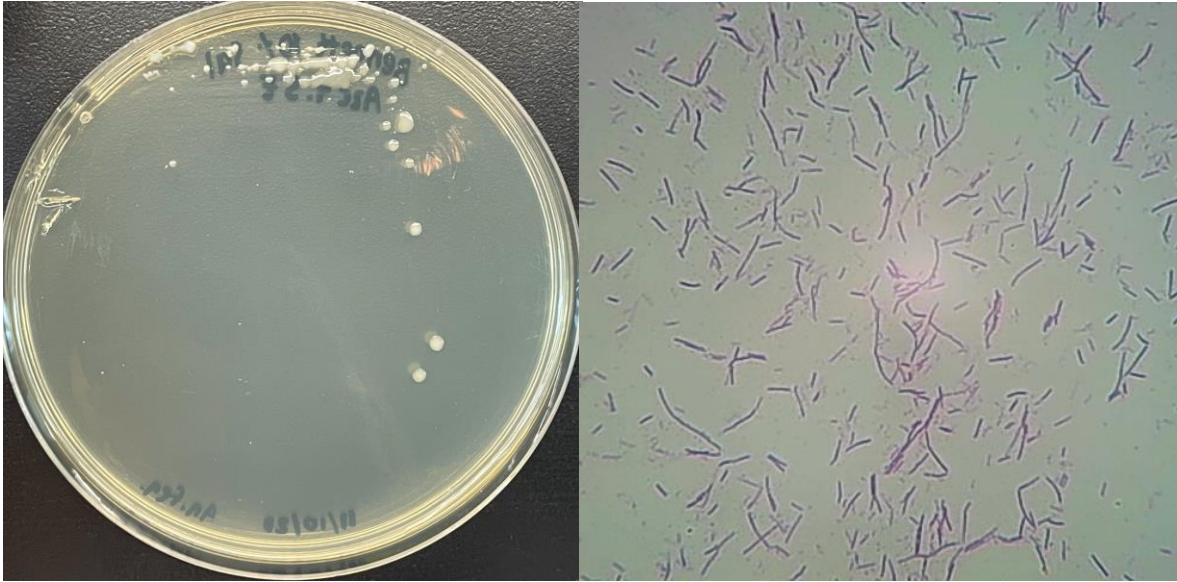
A. Mortiv



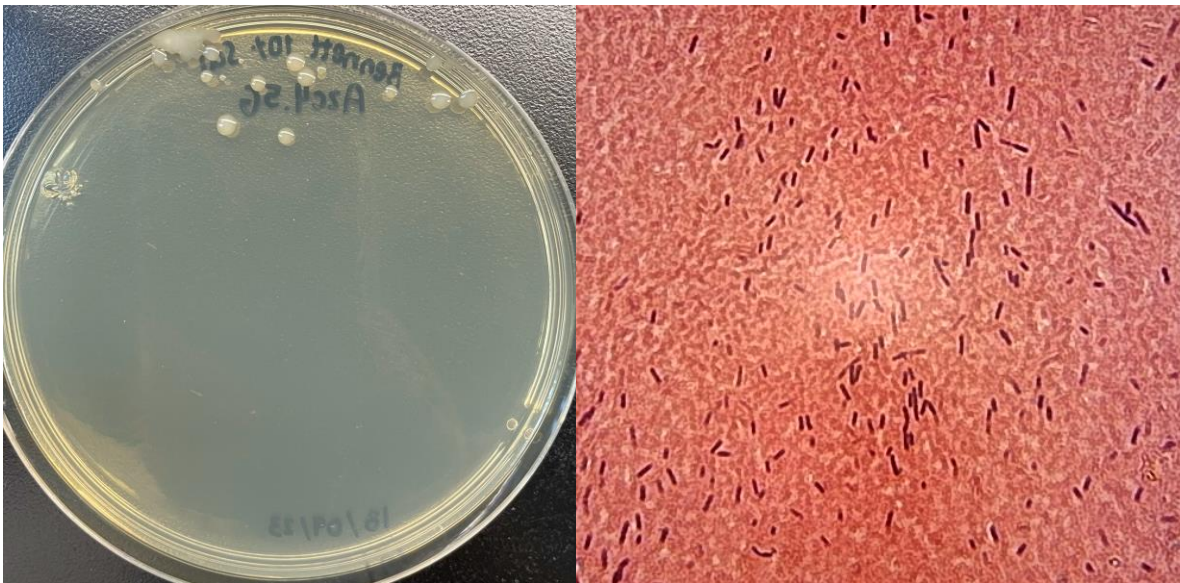
Azc4.5



Azc4.5B



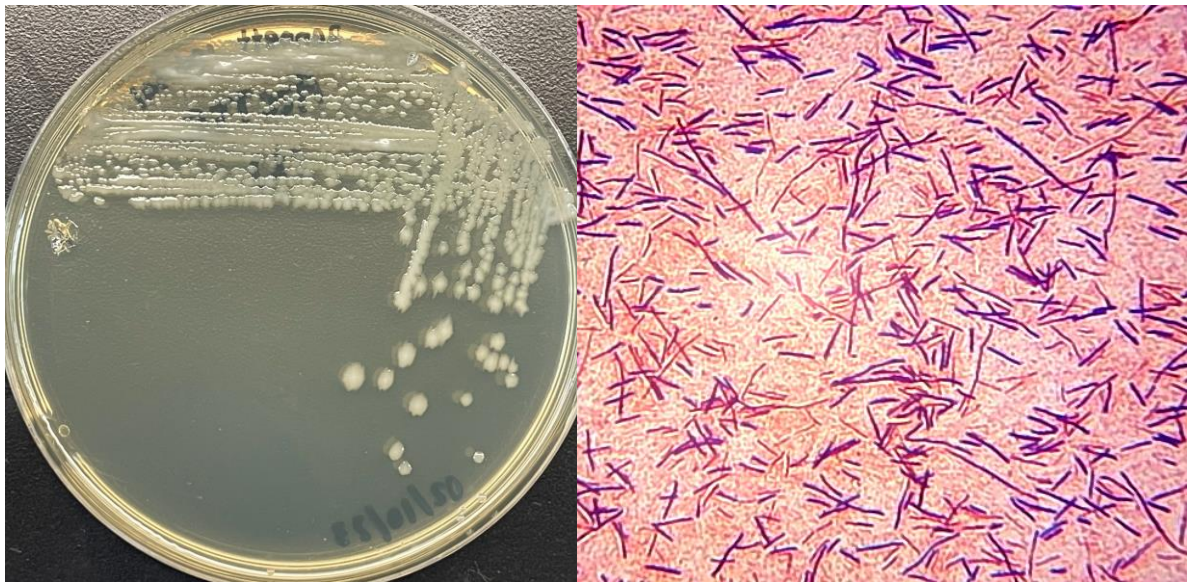
Azc4.5E



Azc4.5G



AzcTS



AzcTSC

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alonso G. Identificación y caracterización de actinobacterias con presencia de los sistemas PKS y NRPS. [Tesis de Doctorado]. Universidad Autónoma del Estado de México. 2017.
2. Ayuso-Sacido A, Genilloud O. Nuevos cebadores de PCR para la detección de sistemas NRPS y PKS-I en actinomicetos: detección y distribución de estas secuencias de genes biosintéticos en los principales grupos taxonómicos. *Ecología microbiana*. 2005; 49(1):10-24. DOI: 10.1007/s00248-004-0249-6.
3. BacDive. *Saccharopolyspora taberi*. s.f. [En línea] Disponible en: DOI:10.13145/bacdive13451.20221219.7.1
4. Barka E. A., Vatsa P., Sánchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Klenk H.-P., Clément C., Ouhdouch Y., & Van Wezel G. P. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2016; 80:1–43. DOI:10.1128/MMBR.00019-15
5. Bessis S., Noussair L., Rodriguez-Nava V., Jousset C., Duran C., Beresteau A., Matt M., Davido B., Carlier R., Bergeron E., Fournier P., Herrmann J., Dinh A. Actinomycetoma caused by *Actinomadura mexicana*, a neglected entity in the caribbean. *Emerging Infectious Diseases*. 2020; 26(2): 379–380. DOI: 10.3201/eid2602.191005
6. Biomérieux. API®: Rendimiento mundialmente conocido. s.f. [En línea] <https://www.biomerieux.com.mx/diagnostico-clinico/productos/apir>
7. Boenel M., Vobis G., & Solans M. Actinobacterias degradadoras de polipropileno. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 2021; 37: 577-588. DOI: <https://doi.org/10.20937/rica.54004>.
8. Bonnet E., Flecher X., Paratte S., Argenson J., Raoult D., & Fournier P. *Actinomadura meyeræ* osteitis following wound contamination with hay in a woman in France: a case report. *Journal of Medical Case Reports*. 2011; 5:32, pp. 1-4. Disponible en: <https://jmedicalcasereports.biomedcentral.com/articles/10.1186/1752-1947-5-32>

9. Bou G., Fernández-Olmos A., García C., Sáez-Nieto J., & Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2011; 29(8): 601–608. DOI: 10.1016/j.eimc.2011.03.012
10. Chávez-Arteaga K., Guato-Molina J., Peñafiel-Jaramillo M., Mestanza-Uquillas C., & Canchignia-Martínez H. Bacterias fluorescentes productoras de metabolitos antagónicos de cultivares nativos de *Musa sp.* y su diversidad filogenética al gen ARNr 16S. *Ciencia y Tecnología*. 2018; 11(2): 17-29. DOI: 10.18779/cyt.v11i2.204
11. Chen J-S, Su M, Shao L, Wang Y-X, Lin H-M, Chen D-J. Investigation of halogenation during the biosynthesis of ramoplanin in *Actinoplanes sp.* ATCC33076. *Applied Microbiology & Biotechnology*. 2016;100(1):289–298. DOI: 10.1007/s00253-015-7014-2
12. Cortés-López N., Ordóñez-Baquera P., & Domínguez-Viveros J. Herramientas moleculares utilizadas para el análisis metagenómico. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 2020; 11(4): 1150-1173. DOI: 10.22319/rmcp.v11i4.5202
13. Domínguez A. Distribución, caracterización e importancia ecológica de *Micromonospora* en nódulos fijadores de nitrógeno de *Lupinus* [Tesis de Doctorado]. Universidad de Salamanca. 2010.
14. Espinosa-Barrera L., Serrano-Posada H., & Centeno-Leija S. *Streptomyces*: “La vieja confiable”. *Herbario CICY*. 2021; 13:36-44. [En línea]: <https://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Desde_Herbario/2021/2021-02-18-Espinosa-et-al.-Streptomyces.pdf>
15. Evangelista, Z., Quiñones, E. & Rincón, G. 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*. 2017; 21(63), 39-51
16. Fang B., Liu H., Pan T., Liu C., Guan X., He H., Yan K., Li J., Xiang W., & Wang X. *Streptosporangium lutulentum sp. nov.*, *Streptosporangium fenghuangense sp. nov.* and *Streptosporangium corydalis sp. nov.*, three novel

- actinobacterial species isolated from National Forest Park of Fenghuang Mountain. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*. 2016; 109: 439–448. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0650-4>
17. García J. Estudio de la bacterioferritina Bfr codificada por el gen SCO2113 de *Streptomyces coelicolor*. [Trabajo de fin de grado]. Universidad de Salamanca. 2020.
 18. González, J.B. Detección de sistemas biosintéticos implicados en la producción de metabolitos secundarios en actinobacterias de origen clínico [Tesis de Doctorado]. Universidad Autónoma del Estado de México. 2021.
 19. González, J.B. Reconsideración taxonómica de actinomicetos aislados de suelos mexicanos. [Tesis de Maestría]. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco. 2016.
 20. Gren T., Ortseifen V., Wibberg D., Schneiker-Bekel S., Bednarz H., Niehaus K., Zemke T., Persicke M., Pühler A., & Kalinowski J. Genetic engineering in *Actinoplanes* sp. SE50/110 – development of an intergeneric conjugation system for the introduction of actinophage-based integrative vectors. *Journal of Biotechnology*, 2016; 232: 79–88. Disponible en: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jbiotec.2016.05.012>
 21. Gunjal A., & Shinde S. *Microbial Diversity and Ecology in Hotspots*. Academic Press. Elsevier. 2022; pp. 362. Disponible en: <https://doi.uam.elogim.com/10.1016/B978-0-323-90148-2.00007-9>
 22. Hall T. A. *BioEdit: An important software for molecular biology*. 2011.
 23. Hidrin N, Goodfellow M, Boiron P, Moreno M, Serrano J. A. Los estreptomicetos: Actualización y revisión didáctica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 2001; 21(1): 36-38. [En línea] Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562001000100006&lng=es
 24. Keikha, N., Ayatollahi, S. A., Nakhaei, A. R., Yadegari, M. H., Shahidi, G. H., & Amiri, S. In Vitro Evaluation of Enzymatic and Antifungal Activities of Soil-Actinomycetes Isolates and Their Molecular Identification by PCR. *Jundishapur*

Journal of Microbiology, 2015; 8(5). [En línea]:
[https://doi.org/10.5812/jjm.8\(5\)2015.14874](https://doi.org/10.5812/jjm.8(5)2015.14874)

25. Kumar S., Nei M., Dudley J., & Tamura K. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform*, 2008; 9:299-306.
26. Lim D, Kwak Y, Jeong-Hwan K, Si-Hwan Ko, Won-Ho Y, Chang-Han K. Antitumor Efficacy of Reticulol from *Streptovorticillium* against the Lung Metastasis Model B16F10 Melanoma: Lung Metastasis Inhibition by Growth Inhibition of Melanoma. *Chemotherapy*. 2003;49(3):146-53. DOI: 10.1159/000070621
27. Madigan M.T., Martinko J. M., Dunlap P.V. & Clark D.P. Brock. *Biología de los microorganismos*, 12^a ed., Pearson Education S.A. 2009; pp. 1259.
28. Mangieri N., Guevara D., Echavarría G., Bertona E, Castello L., Benchetrit G., & N. De Paulis A. Nocardiosis esporotricoides por *Nocardia brasiliensis*. *Revista Argentina de Microbiología*. 2020;53(1):43-47. DOI: 10.1016/j.ram.2020.06.007
29. Parada R., Marguet E., & Vallejo M. Aislamiento y caracterización parcial de actinomicetos de suelos con actividad antimicrobiana contra bacterias multidrogo-resistentes. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2017; 19 (2): 15-23. [En línea]: <https://www.redalyc.org/pdf/776/77654661003.pdf>
30. Quiñones, E. E. Actinobacterias de suelo como potenciales bioherbicidas. 2021. [En línea]: <https://ciatej.mx/el-ciatej/comunicacion/Noticias/Actinobacterias-del-suelo-como-potenciales-bioherbicidas/223#:~:text=Las%20actinobacterias%2C%20tambi%C3%A9n%20conocidas%20como,sedimentos%20de%20lagos%20y%20r%C3%ADos>
31. Reyes A., Rincón G., Evangelista Z., Quiñones E., & López L. Lucha entre microbios: una herramienta para el control de enfermedades de plantas. *Revista Digital Universitaria (rdu)*. 2015; 16 (11): 1-15. [En línea]: <https://www.revista.unam.mx/vol.16/num11/art92/art92.pdf>
32. Rodicio M., & Mendoza M. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2004; 22(4): 238-245. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia->

clinica-28-articulo-identificacion-bacteriana-mediante-secuenciacion-del-13059055#:~:text=La%20secuenciacion%20del%20ADNr%2016S,otras%20ramas%20de%20la%20microbiologia%20ADa.

33. Roes-Hill M., Durrell K., Alarico I., & Meyers P. *Streptosporangium minutum* sp. nov., isolated from garden soil exposed to microwave radiation. *The Journal of Antibiotics*. 2018; 71: 564–574. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41429-018-0036-0>
34. Rosenberg E., DeLong E. F., Lory S., Stackebrandt E., & Thompson F. *The prokaryotes. Actinobacteria*. (4th ed). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2014. DOI 10.1007/978-3-642-30138-4
35. Salas M., Benito S., Pérez A., Del Amo C., Ormazabal M., & Hidalgo M. Secuenciación de bacterias ARNr 16S. *Revista Sanitaria de Investigación*. 2022. [En línea] Disponible en: <https://revistasanitariadeinvestigacion.com/secuenciacion-de-bacterias-arnr-16s/>
36. Sánchez H. Los superpoderes de las plantas: los metabolitos secundarios en su adaptación y defensa. *Revista Digital Universitaria (rdu)*, 2022; 23(2): 1-8. [En línea]: <http://doi.org/10.22201/cuaieed.16076079e.2022.23.2.10>
37. Sánchez-García, B. M., Ramírez-Pimentel, J. G., Guevara-Acevedo, L. P., Raya-Pérez, J. C., Covarrubias-Prieto, J., & Mora-Avilés, M. A. Actinobacterias con potencial antagónico in vitro a hongos fitopatógenos y promoción del crecimiento en plantas de Chile. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 2019; (10): 339-344. DOI: <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i23.2033>.
38. Sayed A. M., Abdel-Wahab N. M., Hassan H. M., & Abdelmohsen U. R. Saccharopolyspora: an underexplored source for bioactive natural products. *Journal of Applied Microbiology*. 2019; 128 (2): 314-329. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.14360>
39. Sayers EW, Beck J, Bolton EE, Bourexis D, Brister JR, Canese K, Comeau DC, Funk K, Kim S, Klimke W, Marchler-Bauer A, Landrum M, Lathrop S, Lu Z, Madden TL, O'Leary N, Phan L, Rangwala SH, Schneider VA, Skripchenko Y, Wang J, Ye J, Trawick BW, Pruitt KD, Sherry ST. Database resources of the National

Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 2021; 49(D1):D10-D17. DOI: 10.1093/nar/gkaa892.

40. Serrano J. A. & Sandoval A. H. Identificación y diagnóstico de actinomicetales patógenos. Venezuela: Editorial venezolana; 2005.
41. Serrano J. A., Díaz C. F., & Uzcátegui N. M. El género *Actinomadura*. Aspectos de su taxonomía, microbiología patología, clínica y terapéutica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología.* 2001; 21(2): 34-37. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562001000200010&lng=es
42. Shiburaj S. Anti-microbial Screening of *Streptosporangium nondiastaticum* TBG-75A20, Isolated from the Forest Soil of South India. *Research Journal of Microbiology.* 2011; 6 (12): 912-918. Disponible en: <https://scialert.net/abstract/?doi=jm.2011.912.918>
43. Songsumanus A., Kuncharoen N., Kudo T., Yuki M., Ohkuma M., Igarashi Y., & Tanasupawat S. *Actinomadura decatromicini* sp. nov., isolated from mountain soil in Thailand. *The Journal of Antibiotics.* 2020. DOI: 10.1038/s41429-020-0353-y
44. Streshinskaya G. M., Sashkov A. S., Tul'skaya E. M., Senchenkova S. N., Dmitrenok A. S., Piskunkova N. F., Bueva O. V., & Evtushenko L. I. Cell Wall Glycopolymers of Type Strains from Three Species of the Genus *Actinoplanes*. *Biochemistry. Biokhimiia,* 2016; 81(9), 999–1012. DOI: 10.1134/S0006297916090091
45. Tamay de Dios L., Ibarra C., & Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad.* 2013; 2(2): 70-78. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2013/ir132d.pdf>
46. Uzcátegui-Negrón M., Serrano J., Boiron P., Rodríguez-Nava V., Couble A., Monié D., Sánchez K., Sandoval H., Reviakina V., Panizo M., & Mendoza M. Clasificación e identificación de especies de actinomicetos: un estudio fenotípico comparativo. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología.* 2009; 29: 91-97. Disponible en: <https://ve.scielo.org/pdf/rsvm/v29n2/art05.pdf>

47. Valenzuela-González F., Casillas-Hernández R., Villalpando E., & Vargas-Albores F. El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias Marinas*. 2015; 41(4): 297–313. DOI: <http://dx.doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492>
48. Wink J., Mohammadipanah F., & Hamed J. *Biology and Biotechnology of Actinobacteria*. Springer International Publishing AG. 2017. DOI: 10.1007/978-3-319-60339-1
49. Wolf T., Droste J., Gren T., Ortseifen V., Schneiker-Bekel S., Zemke T., Pühler A., & Kalinowski J. The MalR type regulator AcrC is a transcriptional repressor of acarbose biosynthetic genes in *Actinoplanes* sp. SE50/110. *BMC genomics*. 2017; 18(1), 562. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3941-x>
50. Yamamura H., Ohnishi Y., Ishikawa J., Ichikawa N., Ikeda H., Sekine M., Harada T., Horinouchi S., Otaguro M., Tamura T., Suzuki K.- I., Hoshino Y., Arisawa A., Nakagawa Y., Fujita N., & Hayakawa M. Complete genome sequence of the motile actinomycete *Actinoplanes missouriensis* 431T (=NBRC 102363T). *Standards in Genomic Sciences*. 2012. 7: 294-303. DOI: 10.4056/sigs.3196539

Vo. Bo. del (la) o los (las) asesores (as) respecto a los contenidos académicos



QFB. Nora Lidia Sánchez Saucedo

Nombre y firma del asesor interno
Laboratorio de Producción de Biológicos.
Número económico: 18752



Dra. Janette B. González Nava

Nombre y firma del asesor externo
Laboratorio de Microbiología Médica y Ambiental, UAEMex.
Cédula 12744827