



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO  
FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA  
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA**

**“BIODIVERSIDAD FENOTÍPICA DE  
ACTINOMICETOS AISLADOS DE SEDIMENTO  
DE ICHAQUEO MICHOACÁN”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA:**

**LUCERO CALDERÓN LÚA**

**ASESOR:**

**M.S.P. KARLA GABRIELA DOMÍNGUEZ GONZÁLEZ**



*Morelia, Michoacán, Agosto - 2013*

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL  
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE LA  
FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA DE  
LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO BAJO LA DIRECCION DE:  
MSP KARLA GABRIELA DOMINGUEZ GONZALEZ  
Y QFB RICARDO GIOVANNI SORIA HERRERA  
Y EN EL DEPARTAMENTO DE SISTEMAS  
BIOLÓGICOS DE LA UNIIVERSIDAD AUTÓNOMA  
METROPILITANA-XOCHIMILCO BAJO LA  
DIRECCIÓN DE:  
DC ANGEL HORACIO SANDOVAL TRUJILLO Y  
QFB NORA LIDIA SÁNCHEZ SAUCEDO.**

*“Una increíble gran multitud de animálculos vivos, nadando más ágilmente de lo que yo antes había visto. Los de más tamaño... retorcían su cuerpo haciendo curvas para ir hacia delante... Es más, los otros animálculos se encontraban en número tan grande que toda el agua parecía estar viva”.*

**Anthony van Leeuwenhoek**

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme dado este tiempo para lograr mis objetivos.

A mis padres Arturo y Angélica por su incondicional apoyo durante toda mi vida. Por sus consejos, sus valores y sobre todo su amor, porque sin ellos nada de esto hubiera sido posible. A mis hermanos Perla, Ale, Katy, Rubén y Cesar les agradezco el estar conmigo en todo momento, tantas risas y amor de su parte es lo que me da fuerza para seguir adelante.

A mis tías y tíos que me apoyaron con los ojos cerrados, me abrieron las puertas de su casa y me trataron como si fuera una de sus hijas y a mis primos que siempre me dieron su cariño.

Agradezco infinitamente a la MSP Karla Domínguez y al QFB Ricardo Soria por haberme permitido aprender de ellos y darme la oportunidad de conocerlos y contar con su amistad, que pese a los miles de regaños siempre supe que contaría con ellos y todo su apoyo, los quiero mucho.

A la QFB Yazmín Cuevas Muñoz, QFB Karina Hernández Ramón, QFB Gerardo “Cacho”, QFB Ricardo Vega, Efraín, Gloria, Chava, “Pato”, y a todos aquellos instructores del laboratorio de microbiología que se convirtieron en mis amigos y con su apoyo y cariño la realización de mi tesis fue muy satisfactoria.

A mis amigos de la 5 sección de la facultad de QFB de la UMSNH y en especial a Héctor, Saúl, Roberto, Fernando, Jorge y Liz por su amistad y apoyo.

Debo agradecer de manera muy especial y sincera al Doctor Horacio Sandoval por aceptarme para realizar esta tesis, su apoyo y confianza en mi trabajo y guiarme en mi formación tanto profesional y personal.

A la QFB Nora Lidia Sánchez Saucedo por su importante aporte y participación en esta tesis, por su paciencia, disponibilidad y dedicación.

A la Doctora Ninfa Ramírez por su apoyo y creer en nuestro trabajo y compartirnos su experiencia y conocimientos.

A mis amigos de la UAM-Xochimilco Janette, Tania, Isaac, Marcos, Copitzyn y Karla a quienes tuve el privilegio de conocer y nunca olvidare.

## ÍNDICE

	<b>PÁGINA</b>
<b>I. ÍNDICE DE FIGURAS</b>	VII
<b>II. ÍNDICE DE TABLAS</b>	VIII
<b>III. RESUMEN</b>	IX
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	2
2.1. HISTORIA DE LOS ACTINOMICETOS	2
2.2. GENERALIDADES DE LOS ACTINOMICETOS	3
2.2.1. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS ACTINOMICETOS	4
2.2.2. CLASIFICACIÓN DE LOS ACTINOMICETOS	6
2.3. PRUEBAS CONVENCIONALES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ACTINOMICETOS	8
2.4. TAXONOMÍA NUMÉRICA	10
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	14
<b>4. HIPÓTESIS</b>	16
<b>5. OBJETIVO GENERAL</b>	16
5.1. OBJETIVOS PARTICULARES	16
<b>6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b>	17
<b>7. MATERIALES Y METODOS</b>	18
7.1. MATERIAL BIOLÓGICO	18
7.2. CRISTALERÍA	19
7.3. MEDIOS DE CULTIVO	19
7.4. EQUIPOS	21
7.5. REACTIVOS	21
7.6. INSUMOS	22
<b>8. METODOLOGÍA</b>	23
8.1. MÉTODOS	23
8.1.1. MUESTREO	23
8.1.2. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS	24
8.2. DETERMINACIÓN DE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	25
8.3. COLECCIÓN DE ACTINOMICETOS	25
8.4. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	25

8.5.	CONSERVACIÓN DE CEPAS	26
8.6.	ELABORACIÓN DE BASE DE DATOS PARA CONFORMAR UN CATÁLOGO DE CEPAS DE ACTINOMICETOS AISLADOS DE SEDIMENTO DE ICHAQUEO MICHOACÁN	26
<b>9.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>27</b>
9.1.	MORFOLOGÍA Y PRUEBAS DE METABOLISMO BIOQUÍMICO	27
9.1.1.	MORFOLOGIA	27
9.1.2.	METABOLISMO BIQUIMICO	47
9.2.	ANÁLISIS TAXONÓMICO DE RESULTADOS	50
<b>10.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>53</b>
<b>11.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>54</b>
<b>12.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>55</b>
<b>13.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>62</b>

<b>I. ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>Figura 1</b> Hipótesis de la Correspondencia Asintótica	11
<b>Figura 2</b> Matriz de datos $n \times t$	12
<b>Figura 3</b> Estrategia experimental	17
<b>Figura 4</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC2	27
<b>Figura 5</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC61	27
<b>Figura 6</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC62	28
<b>Figura 7</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC7	28
<b>Figura 8</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC8	29
<b>Figura 9</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC10	29
<b>Figura 10</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC10'	30
<b>Figura 11</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC11	30
<b>Figura 12</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC12	31
<b>Figura 13</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC13A	31
<b>Figura 14</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC15	32
<b>Figura 15</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC22	32
<b>Figura 16</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC23	33
<b>Figura 17</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC24	33
<b>Figura 18</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC26B	34
<b>Figura 19</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC26R1	34
<b>Figura 20</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC26R2	35
<b>Figura 21</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC28	35
<b>Figura 22</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC301	36
<b>Figura 23</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC302	36
<b>Figura 24</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC303	37

<b>Figura 25</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC304	37
<b>Figura 26</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC305	38
<b>Figura 27</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC308	38
<b>Figura 28</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC309	39
<b>Figura 29</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC310	39
<b>Figura 30</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC31	40
<b>Figura 31</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC33	40
<b>Figura 32</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC341	41
<b>Figura 33</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC342	41
<b>Figura 34</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC351	42
<b>Figura 35</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC352	42
<b>Figura 36</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC37	43
<b>Figura 37</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC38	43
<b>Figura 38</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC39	44
<b>Figura 39</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC40	44
<b>Figura 40</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC411	45
<b>Figura 41</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC412	45
<b>Figura 42</b> Morfología macro y microscópica de cepa U-NICOC42	46
<b>Figura 43</b> Dendrograma obtenido del análisis fenotípico	52

## II. INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Clasificación de los actinomicetos	6
<b>Tabla 2</b> Temperatura y pH de las muestras colectadas en Ichaqueo Michoacán	23
<b>Tabla 3</b> Caracterización fenotípica y % de cepas que dieron positiva la reacción	47
<b>Tabla 4</b> Pruebas bioquímicas y nutricionales realizadas a cada cepa obtenida	49
<b>Tabla 5</b> Características de los grupos formados a partir del análisis fenotípico	51

### III. RESUMEN

La biodiversidad de Actinomicetos presentes en sedimento de agua dulce en la cascada de “Chorro Prieto” ubicada en Ichaqueo Michoacán no ha sido estudiada, por lo que se recolectaron muestras de distintos puntos de referencia dentro de un rango de 50 metros de longitud previos a la caída de la cascada. Posteriormente se realizó un tratamiento a cada muestra de sedimento obtenida que nos permitió inhibir el crecimiento de otros microorganismos. Se seleccionaron las colonias características de actinomicetos en medios enriquecidos y dichas cepas fueron re-aisladas en medios de cultivo selectivos para Actinomicetos. A las cepas obtenidas se les caracterizó tanto macro como microscópicamente, se procedió a conservarlas en crio-congelación. Después se determinó su identidad bioquímica realizando pruebas nutricionales y de metabolismo, obteniendo así, una clasificación mediante un análisis taxonómico de resultados que nos permitiera establecer grupos distintos de Actinomicetos.

## 1. INTRODUCCIÓN

Aunque los primeros actinomicetos fueron aislados a partir de hongos y animales, son el suelo y los sustratos naturales el mayor reservorio de actinomicetos. En el suelo, donde intervienen en los procesos de descomposición de la materia orgánica, los tres géneros más frecuentemente encontrados son *Streptomyces*, *Nocardia* y *Micromonospora*.

También podemos encontrar actinomicetos en aguas dulces y en sedimentos. El estado de Michoacán que proviene del Purépecha “Michmacuán” que significa “lugar junto al agua”, es un lugar con gran diversidad de cauces naturales, los cuales carecen de estudios sobre su biodiversidad específicamente actinomicetos. Un ejemplo es la cascada “Chorro Prieto” ubicada en la localidad de Ichaqueo, municipio de Morelia, Michoacán. Esta zona virgen de bosques templados con abundantes lluvias en verano, donde la flora predominante son los pinos y encinos así como una fauna diversa, se ubica a 17 km de Morelia a 2440 msnm, todas estas características generan las condiciones propicias para el desarrollo de este grupo de microorganismos poco estudiados.

El interés por los actinomicetos comenzó a raíz del descubrimiento de la capacidad de estos microorganismos de producir antibióticos. Aunque la búsqueda de compuestos bioactivos sigue en auge, el interés por los actinomicetos se ha diversificado y actualmente ocupa áreas muy diversas ya que por otra parte pueden ser patógenos tanto de plantas, de animales como de humanos. Por la diversidad de hábitats que pueden colonizar este grupo de microorganismos tiene un enorme interés ecológico.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. HISTORIA DE LOS ACTINOMICETOS.

La familia de los *Actinomycetaceae* fue creada por Buchanan en 1918 y fue utilizada para acomodar diversos organismos, como los miembros del género *Nocardia*, *Actinomyces*, *Actinobacillus* y *Leptotrichia* (Schaal *et al.*, 2006).

En 1888 el veterinario francés Edmond Nocard publicó la primera descripción de un padecimiento clínico causado por un actinomiceto aerobio causante de un padecimiento linfático en el ganado bovino en la isla de Guadalupe (Antillas Francesas). Nocard descubrió esta frecuente y fatal enfermedad de ganado como un proceso granulomatoso que contenía senos supurativos con formación de abscesos y frecuente implicación pulmonar (Mcneil *et al.*, 1994). Un año después en 1889, Trevisan caracterizó el agente etiológico aislado por Nocard a partir de animales infectados y en honor a Nocard lo llamó *Nocardia farcinica*, creando así el género *Nocardia* (Mcneil *et al.*, 1994).

El orden de los Actinomycetales Buchanan 1918, contaba con cinco géneros en 1948 y nueve en 1958. Dado el creciente interés por los actinomicetos en estos últimos años el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Williams *et al.*, 1989) dedica el volumen 4 de su 1ª edición a la revisión, adaptación y ampliación de la sección 17 del volumen 2 de la misma edición (Sneath *et al.*, 1986). El estudio y clasificación de los actinomicetos en el Manual Bergey's se fundamenta en la división en diferentes secciones supragenéricas basándose principalmente en características quimiotaxonómicas, como el tipo de pared celular, la disposición de los conidios y la presencia o ausencia de esporangio. Existen algunos géneros que no son fáciles de clasificar y por ello se agrupan en la última sección dedicada a los actinomicetos bajo el epígrafe de "Otros Géneros". El resto aparecen en las secciones de la 26 a la 32, recogiendo hasta la fecha de publicación 40 géneros.

La 9ª edición del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994) engloba a los actinomicetos en diferentes grupos que abarcan del 22 al 29, variando el número de géneros que se incluyen y su división en los distintos subgrupos. El número de géneros integrantes se ve ampliado a 48 a causa de la aparición de 10 nuevos géneros y

a la fusión de otros 2. Tal es el caso de varios géneros entre los cuales se encuentran *Gordonia* o *Tsukamurella*, mientras que *Faenia* y *Pasteuria* han sido reclasificadas.

El estudio de actinomicetos ha sido llevado a cabo tradicionalmente mediante técnicas de cultivo dependiente (recuentos en placa de cultivo). Hiltner & Störmen (1903) (citado en Waksman 1967) fueron los primeros en cuantificar este grupo en el suelo, encontrando que representan cerca del 13 al 30% de los microorganismos. Posteriormente, Conn et al. (1996) (citado en Waksman 1967) reportaron que los actinomicetos representan más del 40% de la comunidad en suelos ricos en raíces y, aproximadamente, el 21% en suelos cultivados. Xu et al. (1996) estudiaron la diversidad y las características biológicas de actinomicetos acuáticos en 12 lagos del “Middle Plateau” de Yunnan en China, aislando 60 géneros diferentes, siendo *Micromonospora* el dominante, seguido por *Streptomyces*. Correlacionado con esto, Hua-Li et al. (1996), también, estimaron la diversidad de actinomicetos en suelos de la misma región china por medio del aislamiento y enumeración en medios de cultivo de enriquecimiento. Reportaron una mayor diversidad en suelos bajo bosque primario, seguida por suelos bajo bosque secundario y, finalmente, por granjas cultivadas con vegetales. El género *Streptomyces* fue el más importante, representando el 90% de la diversidad total.

## **2.2. GENERALIDADES DE LOS ACTINOMICETOS**

El término actinomiceto es una designación informal para las bacterias que pertenecen al orden de los actinomicetales. En un principio estos microorganismos fueron considerados como hongos, debido a que poseen hifas aerobias verdaderas. Sin embargo estudios realizados en su composición de su pared celular, específicamente en su envoltura lipídica celular y a la composición de peptidoglicano, demostraron que los actinomicetos son bacterias aerobias verdaderas (Mcneil *et al.*, 1994).

Los Actinomicetos son bacterias Grampositivas que generalmente en algún momento de su ciclo de crecimiento desarrollan células filamentosas, ramificadas que fragmentan en elementos cocoides y/o bacilares (Serrano *et al.* ,2005).

Los géneros dentro de este grupo son muy diversos e incluyen algunos que pueden ser patógenos tanto para el hombre y animales. Los más importantes de estos son los llamados corineformes y nocardioformes y que incluyen los siguientes géneros: *Corynebacterium* (*C.diphtheriae*), *Mycobacterium* (*M.tuberculosis*), *Nocardia* (*N.asteroides*, *N.otitidiscaviarum*, *N.brasiliensis*), *Rhodococcus* (*R.equi*), *Gordonia*, *Tsukamurella* y *Actinomadura* (*A. madurae*).

Otros géneros importantes son: *Streptomyces* y *Dermatophilus*, así como los actinomicetos anaerobios: *Actinomyces*, *Arachnia* y *Rothia* (Serrano *et al.* ,2005) (tabla 1).

### **2.2.1. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS ACTINOMICETOS**

Los actinomicetos constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos: son bacterias Gram positivas que se caracterizan por su capacidad de formar filamentos ramificados. El orden de los Actinomycetales comprende 63 géneros constituyendo aproximadamente del 20-60% de la población microbiana del suelo (Franco Correo, 2008).

En la actualidad, los actinomicetos se encuentran incluidos en el dominio Bacteria debido a varias razones: la pared celular está compuesta por peptidoglicano, el diámetro de sus hifas es inferior al de los hongos, son sensibles a los antimicrobianos pero presentan resistencia a los antifúngicos y la disposición de su material genético es típicamente procariótica, aunque se caracterizan por presentar un alto contenido de guanina y citosina en su DNA, encontrándose entre el rango de 51 a 78% G+C. Estas bacterias son aerobias y algunas anaerobias, pudiéndose encontrar en animales o en el hombre; son heterótrofas, por lo cual pueden utilizar fuentes de carbono simples, complejas y compuestos moleculares orgánicos tales como ácidos, azúcares, polisacáridos, lípidos, proteínas e hidrocarburos alifáticos. Utilizan como fuentes de nitrógeno amonio, nitratos, aminoácidos, peptonas y un gran número de proteínas. Frecuentemente, alcanzan grandes densidades poblacionales en suelos con altos contenido de materia orgánica y amplias reservas de carbono asimilable y humus (Franco Correo, 2008).

Los actinomicetos también cuentan con diversas e importantes capacidades fisiológicas y metabólicas, como es la producción de enzimas extracelulares y la formación de metabolitos secundarios. Muchos de estos metabolitos secundarios son potentes

antibióticos, como lo es la estreptomina producida por el género *Streptomyces*; que es uno de los géneros más explotados por la industria farmacéutica debido a su capacidad de producir antibióticos (Berdy *et al.* ,2004).

Estos organismos son los causantes del olor característico a moho o a tierra húmeda de los campos recién arados. Este olor característico se origina de la producción de una serie de metabolitos denominados “*geosminos*”. Estas sustancias son compuestos sesquiterpenoides, anillos de carbono insaturados, oxígeno e hidrógeno. La primera geosmina, descubierta tiene el nombre químico de trans-1,10—dimetil-trans-9-decanol. Los actinomicetos son capaces de degradar muchas sustancias complejas y consecuentemente juegan un papel muy importante en la química del suelo (Berdy *et al.* ,2004).

Entre los microorganismos del suelo, los actinomicetos son uno de los grupos de bacterias más abundantes (90%), mostrando actividad biodegradativa al secretar un amplio rango de enzimas que les permiten metabolizar moléculas recalcitrantes. También exhiben diferentes estrategias, desde ciclos de rápida proliferación y esporulación, hasta el mantenimiento de poblaciones por prolongados periodos de tiempo. Esta versatilidad metabólica y morfológica les confiere un gran potencial para desempeñarse en procesos de biorremediación, incluyendo la remoción de metales (Albarracín *et al.* 2005). De igual manera, desempeñan un rol crucial en la sostenibilidad a largo plazo de los sistemas naturales y agrícolas, debido al papel que cumplen en la descomposición de la materia orgánica, fijación de nitrógeno (*Frankia sp.*), degradación de agroquímicos y el control biológico de plagas en plantas y animales (Williams *et al.* 1984). Una de sus características más importantes es su capacidad para producir antibióticos (Heuer *et al.* 1997), enzimas y productos bioactivos. Boudemagh *et. al* (2005) mencionan que los actinomicetos representan la principal fuente de metabolitos secundarios con actividad anticelular. Las especies pertenecientes al género *Streptomyces* constituyen el 75% del total de la población con capacidad para producir moléculas con actividad antibiótica. Al formar parte del sistema de descomposición de la materia orgánica, los actinomicetos pueden ser indicadores de fertilidad y servir como elemento de aproximación a la dinámica de un ecosistema, teniendo en cuenta que su funcionamiento, antes y después de un proceso de perturbación, está influenciado por las poblaciones microbianas edáficas (Kennedy & Smith 1995).

## 2.2.2. CLASIFICACIÓN DE LOS ACTINOMICETOS

Los actinomicetos son aerobios, anaerobios facultativos o anaerobios estrictos; los actinomicetos aerobios pertenecen al orden de los *Actinomycetales*. Hay más de 40 géneros considerando principalmente los de importancia clínica.

TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE ACTINOMICETOS		
FAMILIA	CARACTERÍSTICAS	GÉNERO
<i>Actinomycetaceae</i>	Filamento ramificado con fragmentos. Sin micelio aéreo. Paredes celulares variables que incluyen tipo V y VI.	<i>Actinomyces</i> <i>Agromyces</i> <i>Arachnia</i> <i>Bacterionema</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Rothia</i>
<i>Actinoplanaceae</i>	GRUPO A Sin micelio aéreo. Pared celular tipo II. Zoosporas en vesícula (esporangio).  GRUPO B Micelio Aéreo Pared celular tipo III Esporas con motilidad o sin ella, formadas dentro de vesículas (esporangio)	<i>Actinoplana</i> <i>Ampullariella</i> <i>Dactilosporangium</i>  <i>Planobispora</i> <i>Planomonospora</i> <i>Spirillospora</i> <i>Streptosporangium</i>
<i>Dermatophilaceae</i>	Micelio dividido en todos los planos, sin micelio aéreo. Pared celular tipo III. Forma elementos móviles (zoosporas).	<i>Dermatophilus</i> <i>Geodermatophilus</i>
<i>Frankiaceae</i>	Simbióticas obligadas, formando nódulos en raíces de plantas no leguminosas que pueden fijar nitrógeno.	<i>Frankia</i>
<i>Micromonosporaceae</i>	Únicamente micelio vegetativo. Pared celular tipo II. Forma esporas individuales, sensibles al calor.	<i>Micromonospora</i>
<i>Mycobacteriaceae</i>	Crecen como bacilos, filamentos ramificados, ocasionalmente con micelio rudimentario. Fuertemente ácido resistente. Pared celular Tipo IV. Alto contenido en lípidos que incluye ácidos micólicos.	<i>Mycobacterium</i> <i>Micrococcus</i>
<i>Nocardiaceae</i>	Micelio vegetativo que fragmenta, forma ácidos nocardiomicólicos (lípidos LCN-A). Pared celular tipo IV. Se pueden formar cadenas de esporas en el micelio vegetativo y aéreo.  Micelios vegetativos no fragmentados. Micelio aéreo. Aeróbios. Pared celular tipo I. Esporas presentes en micelio aéreo, pero también pueden ser observadas en micelios vegetativos. Cadenas de artrosporas formadas dentro de una vaina. Esporas principalmente no móviles.	<i>Rhodococcus</i> <i>Micropolyspora</i> <i>Nocardia</i>  <i>Chainia</i> <i>Elytrosporangium</i> <i>Intrasporangium</i> <i>Kitasatoa</i> <i>Microellobisporia</i> <i>Streptovercillium</i> <i>Streptomyces</i>

**TABLA 1. CLASIFICACION DE ACTINOMICETOS**

<b>FAMILIA</b>	<b>CARACTERISTICAS</b>	<b>GENERO</b>
<i>Thermomonosporaceae</i>	<p>Micelio aéreo y vegetativo.                      Micelio vegetativo puede fragmentar.                      Pared celular tipo III (algunos IV)</p> <p>Esporas individuales, en paredes o en cadenas cortas, encerradas en vaina.</p>	<p><i>Actinomadura</i>  <i>Microbispora</i>  <i>Microtetraspora</i>  <i>Saccharomonospora</i></p> <p><i>Thermomonospora</i></p>
No designados	<p>Micelio rudimentario, se rompe en elementos móviles. Gram negativos.</p> <p>No forma micelio aéreo. Micelio vegetativo rompe en elementos móviles (fragmentación de esporas). Pared celular tipo IV.</p> <p>Sin micelio aéreo. Fragmentos de micelio vegetativo, producen esporas individuales. La pared celular contiene lisina pero no ácido aspártico.</p> <p>Micelios aéreos y vegetativos no fragmentados. Pared celular tipo IV. Esporas formadas en micelios vegetativo y aéreo.</p> <p>Sin micelio vegetativo. Pared celular tipo I. Pedúnculos que soportan cadenas cortas de oosporas.</p>	<p><i>Mycoplana</i></p> <p><i>Oerskovia</i></p> <p><i>Promicromonospora</i></p> <p><i>Pseudonocardia</i></p> <p><i>Sporichthya</i></p>
Modificado de Fuente: Serrano, José A ,Sandoval Trujillo, A.H.,. “Manual de Laboratorio para el Estudio de los Actinomicetales Patógenos”. 1ª ed. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela, 1992		

### 2.3. PRUEBAS CONVENCIONALES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ACTINOMICETOS

Las técnicas químicas y genéticas modernas han establecido la gran diversidad de este grupo, pero las características fenotípicas siguen constituyendo una parte importante de la definición microbiológica. Los actinomicetos aerobios como un todo se ubican taxonómicamente en la clase *Actinobacteria*, orden *Actinomycetales*, suborden *Corynebacteriineae*. Aunque la taxonomía y la nomenclatura de estas bacterias cambian continuamente, sigue siendo útil una caracterización fenotípica provisoria del grupo (Koneman *et al.* 2006).

Las cepas aisladas de distintas especies en general provienen del suelo, de los sedimentos marinos y de las heces de diversos animales. Se los debe considerar patógenos oportunistas, que producen infección sobre todo en los individuos cuyos mecanismos de defensa están deprimidos. Sin embargo, estas bacterias han proporcionado algunos de los antibióticos más importantes: estreptomicina (especies de *Streptomyces*), vancomicina (*Amycolatopsis orientalis*), macrolidos (especies de *Micromonospora*). Con mucho, los patógenos más importantes están en el género *Nocardia* (Koneman *et al.* 2006).

Desde un punto de vista práctico, estos microorganismos pueden ser reconocidos en el laboratorio por que forman colonias lisas, firmes, adherentes, cerosas o calcáreas que crecen después de 3 días a 2 semanas de incubación. Pueden tener una pigmentación ocre, rosada, anaranjada o gris. El olor a sótano húmedo o a suelo recién removido es un indicio importante por el cual se los puede reconocer. La temperatura óptima de crecimiento es de 30°C a 36 °C, tanto en la incubadora de CO<sub>2</sub> (como para el cultivo de micobacterias) como en el medio ambiente (como en las incubadoras utilizadas para el cultivo de hongos) (Koneman *et al.* 2006).

Las pruebas o ensayos bioquímicos, son pruebas simples que se han desarrollado para demostrar en forma clara una determinada característica bioquímica como presencia o ausencia de una determinada actividad enzimática, grupo de enzimas o determinada vía metabólica, crecimiento a una determinada temperatura, crecimiento en presencia de inhibidores, etc. Para llevarlas a cabo, se pueden utilizar sistemas de trabajo (medios de

cultivo, indicador, revelador, etc.) que pueden ser diferentes aún para el mismo ensayo si se trata de diferentes microorganismos, por ejemplo se debe suplir con factores de crecimiento el medio de cultivo para estudiar la fermentación de distintos azúcares cuando se sabe que el microorganismo en estudio es exigente (Wilson et al. ,1992).

Las pruebas fenotípicas convencionales que pueden ser utilizadas rutinariamente para identificar las principales especies de actinomicetos se basan en la observación de las características morfológicas macroscópicas de las colonias en los diferentes medios de cultivo. Crecen bien en medios con base de huevo Lowenstein- Jensen o en agar sintético de Middlebrook y en la mayoría de los medios de aislamiento de hongos que carecen de cicloheximida. La mayoría de los cultivos bacterianos de rutina se mantienen sólo durante 48 horas (Koneman *et al.* 2006).

La observación de morfología microscópica se realiza con las tinciones de Gram, Ziehl-Neelsen o Kinyoun; Todas las especies son Gram positivas, aunque las especies de *Nocardia*, en particular, tienden a presentar un patrón en forma de rosario y ser Gram variable. Por lo tanto, el hallazgo de microorganismos ramificados Gram positivos o Gram variables frágiles (1  $\mu\text{m}$  de diámetro) debe alertar acerca de la posibilidad de un actinomiceto aerobio; las placas de aislamiento deben mantenerse durante 2 a 4 semanas para asegurar el crecimiento. La descomposición de algunos sustratos específicos, tales como: caseína, tirosina, xantina, hipoxantina, urea, etc.

En los casos difíciles, se requiere el análisis de la pared celular o del genoma ya que la composición de la pared celular de los actinomicetos aerobios es útil tanto desde el punto de vista taxonómico como diagnóstico pero lamentablemente estas técnicas sólo se encuentran en laboratorios de referencia. (Koneman *et al.* 2006).

## 2.4. TAXONOMÍA NÚMÉRICA

La idea de cuantificar las relaciones existentes entre las especies (taxa) se le ocurrió a varios taxónomos desde principios de siglo y aún antes (siglo XVIII), como el botánico francés Michel Adanson. Sin embargo ninguno de estos métodos propuestos fue adoptado por los investigadores para su trabajo posterior. Sneath y Sokal (1957) explicaron esta situación diciendo que los métodos no estaban lo suficientemente elaborados para ofrecer una adecuada codificación de caracteres, una forma fácil para el cálculo de las correlaciones y que no eran capaces de construir una clasificación. La taxonomía numérica además de usar un gran número de caracteres, para ser práctica, requiere del uso de computadoras para su cálculo; todo esto aunado a la tendencia de que la taxonomía debe reflejar las vías evolutivas que se dan entre los organismos (Serrano *et al.*, 2005).

Algunos autores concluyeron que no existe ninguna razón lógica para asignar diferente peso a los caracteres estudiados, ya que en un estudio de 17 UTOs (*unidades taxonómicas operacionales*) ha sido puesto en evidencia que aún valores 1.000 veces diferentes en 18 de 135 características analizadas tienen poco efecto en su taxonomía. En cualquier estudio de taxonomía numérica la cuestión de cuántos y cuáles caracteres tomar en cuenta es de capital importancia. A menos que cada carácter pudiera proveer información independiente de un gran número de *loci*, no se puede aceptar que un número reducido de caracteres, digamos 40, podría representar una fracción razonable de la información genética del taxón descrito puesto que los taxa están definidos por la coincidencia de muchas características, que por otro lado no necesariamente están presentes en todos los miembros de un taxón. Esta postura se opone a la taxonomía tradicional que plantea que los taxa son monofiléticos y por lo tanto se puede establecer que una clasificación será más "natural" entre mayor sea el número de propiedades estudiadas (Serrano *et al.*, 2005).

La forma de sortear este problema es mediante el uso de caracteres estables que se ajusten a la Hipótesis de la Correspondencia Asintótica de Sneath y Sokal que establece que a partir de un cierto número de caracteres analizados, la inclusión de más características ya no afecta la estructura taxonómica encontrada (Figura 1).

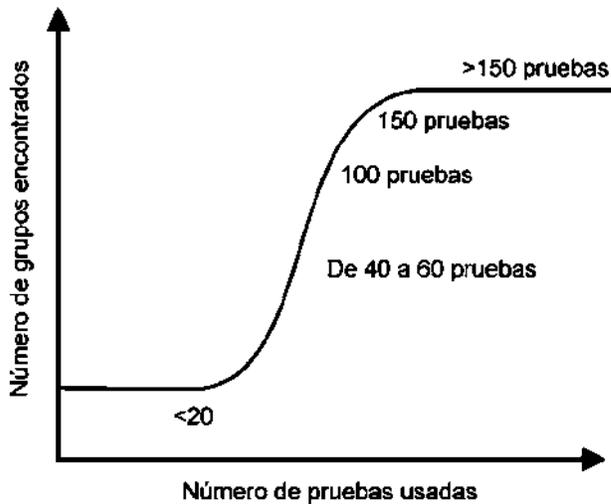


Figura 1.

Hipótesis de la Correspondencia Asintótica (Sneath y Sokal, 1963)

Estos grupos pueden representar nuevas especies o pueden quedar asociadas a cultivos de referencia que hayan sido incluidos en el análisis. Una vez que una clasificación numérica ha sido construida, se puede determinar cuáles son los marcadores específicos del grupo y así poderlos proponer para su identificación. Esto da lugar a claves dicotómicas y tablas que pueden ser usadas posteriormente en la identificación de microorganismos a nivel de diagnóstico clínico. Es evidente que se requiere analizar un gran número de cepas para poder aplicar el tratamiento estadístico adecuado que le dará confiabilidad a las claves.

En la taxonomía numérica el punto de partida generalmente es la construcción de una matriz:

$n \times t$

Dónde;

$n$  representa el número de caracteres determinados para cada cepa.

$t$  es el número de cepas.

En lo que podría llamarse la taxonomía numérica convencional, esta matriz se usa para determinar el parecido entre las cepas calculando los **coeficientes de similitud**. (Serrano *et al.*, 2005).

Los resultados de estos análisis generalmente se presentan en la forma de **dendrogramas y/o matrices jerarquizadas**.

El propósito primario de la taxonomía numérica es el de proveer clasificaciones que sean precisas, reproducibles y que contengan un gran contenido de información. El uso de técnicas numéricas para la construcción de clasificaciones biológicas nos lleva a comprender que la circunscripción de taxa sigue ciertos principios establecidos y no es algo que simplemente sucede (Serrano *et al.*, 2005).

Los pasos lógicos y la secuencia a seguirse, pueden ser aplicados a todas las ramas de la Biología y la Sistemática. Estos pasos, en el caso de las bacterias, son los siguientes:

1. Las bacterias (**t**) por ser clasificadas son colectadas y examinadas a través de un número grande de pruebas (**n**) bioquímicas, morfológicas, nutricionales y fisiológicas. En seguida se prepara una matriz de datos **n x t** (Figura 2).

		PRUEBAS							
		A	B	C	D	E	F	G	H
CEPAS DE MICROORGANISMOS	1	-	+	+	+	+	+	-	-
	2	+	-	+	+	-	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	+	-	+	-	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	-	-	-	+
	6	-	-	+	+	+	-	+	-
	7	+	+	+	+	-	+		+
	8	+	-	+	-	+	-	+	-
	9	-	+	-	+	+	-	+	+
	10	-	-	+	-	+	+	+	+

Figura 2.

Matriz de datos **n x t**

2. Utilizando los resultados de la matriz de datos las cepas son clasificadas con base en sus similitudes o diferencias.
3. Las cepas que parecen muy próximas la una a la otra, son agrupadas (usando técnicas para hacer "grupos").
4. Los grupos numéricamente definidos son examinados y cualquier carácter que los distingue, es extraído de la matriz de datos y analizado estadísticamente para ser propuesto como prueba de identificación con valor diagnóstico.

Finalmente, podríamos resumir los principios de la taxonomía numérica como sigue:

- a. La taxonomía ideal es aquella en la cual las taxa contiene el máximo de información basada en el mayor número posible de caracteres.

- b. A cada carácter se le da un peso igual al crear taxa naturales.
- c. El grado de relación entre dos unidades taxonómicas operacionales (UTOs) es una expresión de la similitud presentada por los diversos caracteres que son comparados.
- d. Se pueden relacionar grupos distintos debido a que existe correlación entre diversos caracteres en los taxa que se están estudiando y que pudieran ser producto de procesos de evolución convergente.
- e. La taxonomía es una ciencia estrictamente empírica.

### 3. JUSTIFICACIÓN.

Existe interés tanto académico como industrial, por los actinomicetos, en parte por el número de metabolitos secundarios únicos y biológicamente activos reportados a partir de estos.

Actualmente, muchos científicos se han centrado en programas de búsqueda de nuevos antimicrobianos, principalmente de origen actinomicetal, por su prolífica producción de antibióticos naturales (Oskay M. *et al.* 2004). Se ha evidenciado que muchos de ellos son productores de metabolitos con actividad antimicrobiana, antiparasitaria, antiviral, antitumoral, citotóxica, etc; cuyas estructuras químicas son únicas (Prashith *et al.* 2010).

Los actinomicetos representan un grupo ubicuo de microorganismos ampliamente distribuido en ecosistemas naturales y tienen gran importancia en la participación de la degradación de materia orgánica, además de ciertas propiedades fisiológicas que los hacen particulares (Ghanem *et al.* 2000).

Estos microorganismos resultan ser abundantes en suelos (Ben-Omar *et al.* 1997), sin embargo; también se encuentran en ambientes acuáticos, dulces y marinos (Leiva *et al.* 2004). Dentro de sus características particulares presentan un olor típico a suelo húmedo por la producción de un metabolito llamado “geosmina”, adicionalmente presentan una actividad metabólica alta, producen terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares con las que son capaces de degradar la materia orgánica de origen vegetal y animal (Ezziyyani *et al.* 2004). Como la gran mayoría de bacterias que son abundantes en suelo, presentan un importante papel ecológico en el mismo (Ben-Omar *et al.* 1997). Algunos géneros han sido reportados como fijadores de nitrógeno atmosférico, como *Frankia* y algunas cepas pertenecientes a las familias *Thermomonosporaceae* y *Micromonosporaceae* (Valdés *et al.* 2005; Franco-Correa 2008).

El estudio de los actinomicetos en aguas dulces y sedimentos posee un gran interés dentro del área microbiológica, ya que al ser un grupo poco estudiado a nivel mundial nos habrá un sinnúmero de posibilidades de estudio no sólo en el Estado de Michoacán sino en todo el país. Estos microorganismos constituyen uno de los grupos más importantes en la población microbiana del suelo y aún así se desconoce su biodiversidad específica en el

estado, mismo que nos brinda una gran variedad de cauces naturales sin polución y suelos ricos en raíces lo que nos abre aún más las posibilidades de estudiarlos debido a sus características inocuas. Por lo anterior, en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en colaboración con la Universidad Autónoma Metropolitana campus Xochimilco nos dimos a la tarea de recolectar muestras de sedimento de agua dulce en la cascada “Chorro Prieto” ubicada en Ichaqueo, Michoacán; para realizar una búsqueda que nos permitiera conocer la biodiversidad de actinomicetos presentes en el cauce, lograr su aislamiento, determinar su identidad bioquímica y establecer una clasificación mediante un análisis taxonómico con perspectiva de encontrar especies no clasificadas ni conocidas.

#### **4. HIPÓTESIS.**

La creación y caracterización fenotípica de una colección de cepas de actinomicetos aislados del sedimento de Ichaqueo Michoacán nos permitirá conocer una gran diversidad de este grupo de microorganismos presentes en el Estado.

#### **5. OBJETIVOS.**

##### **5.1. GENERAL.**

Aislar cepas de actinomicetos del sedimento de agua dulce en Ichaqueo Michoacán, determinar sus características macro y microscópicas, así como su identidad bioquímica y a partir de esto establecer una clasificación utilizando taxonomía numérica.

##### **5.2. PARTICULARES**

- Muestrear sedimento de agua dulce en la cascada de “Chorro Prieto” ubicada en Ichaqueo Michoacán, buscando cepas características de actinomicetos.
- Aislar cepas representativas de actinomicetos y determinar sus características morfológicas.
- Conservar y catalogar las cepas de actinomicetos aislados para el cepario-colección del laboratorio de microbiología QFB - UMSNH.
- Realizar análisis taxonómico de resultados y establecer un dendrograma que permita la posible identificación de las cepas aisladas.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

Se llevó a cabo la recolección de 8 muestras de sedimento de agua dulce en un segmento de aproximadamente 50 metros previos a la caída de la cascada de “Chorro Prieto” ubicada en Ichaqueo Michoacán, para realizar la búsqueda intencionada de Actinomicetos. Posteriormente se efectuó un tratamiento a las muestras que nos permitió inhibir el crecimiento de otros microorganismos y seleccionar las colonias características de actinomicetos en medios de cultivo enriquecidos de acuerdo a su morfología colonial. Después se procedió a re-aislarlas en medios selectivos para obtener las cepas puras y caracterizarlas tanto macro como microscópicamente utilizando la tinción Gram y Ziehl-Neelsen. Al realizar lo anterior se obtuvieron datos para su clasificación y la creación de una colección de cepas de actinomicetos aislados de sedimento de agua dulce de Ichaqueo Michoacán.

La segunda parte de la estrategia experimental, consistió en realizar pruebas fenotípicas para conocer su identidad metabólica. Con los resultados obtenidos en general se realizó una clasificación de los actinomicetos empleando taxonomía numérica.

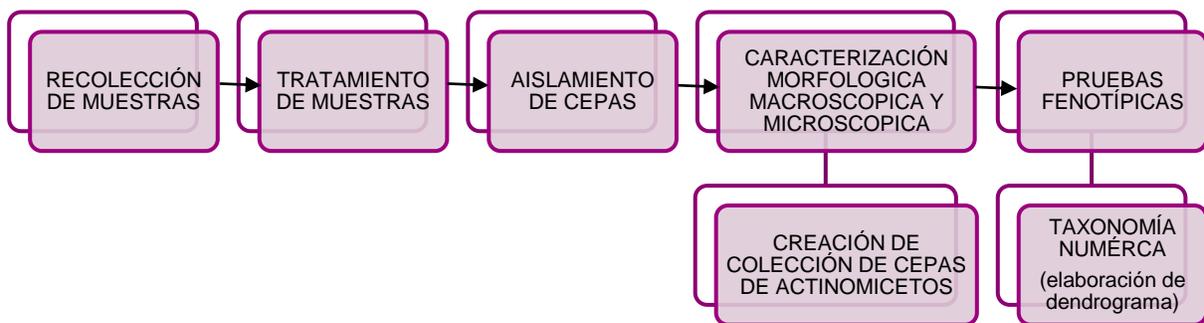


Figura 3. Estrategia experimental

## 7. MATERIALES Y METODOS.

### 7.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

Se estudiaron un total de 39 cepas de actinomicetos aisladas, a las cuales se les dio el siguiente nombre al azar para su posterior reconocimiento, anteponiendo la palabra **U-NICO** a la numeración haciendo referencia a la **UNIVERSIDAD NICOLAITA**:

A) U-NICOC2	S) U-NICOC301	K1) U-NICOC411
B) U-NICOC61	T) U-NICOC302	L1) U-NICOC412
C) U-NICOC62	U) U-NICOC303	M1) U-NICOC42
D) U-NICOC7	V) U-NICOC304	
E) U-NICOC8	W) U-NICOC305	
F) U-NICOC10	X) U-NICOC308	
G) U-NICOC10´	Y) U-NICOC309	
H) U-NICOC11	Z) U-NICOC310	
I) U-NICOC12	A1) U-NICOC31	
J) U-NICOC13A	B1) U-NICOC33	
K) U-NICOC15	C1) U-NICOC341	
L) U-NICOC22	D1) U-NICOC342	
M) U-NICOC23	E1) U-NICOC351	
N) U-NICOC24	F1) U-NICOC352	
O) U-NICOC26B	G1) U-NICOC37	
P) U-NICOC26R1	H1) U-NICOC38	
Q) U-NICOC26R2	I1) U-NICOC39	
R) U-NICOC28	J1)U-NICOC40	

## 7.2. CRISTALERÍA.

- Tubos de ensaye de 13X100 con tapón de rosca marca Kimax®.
- Tubos de ensaye de 13X75 con tapón de caucho.
- Tubos de ensaye de 16X100 con tapón de rosca marca Pyrex®.
- Tubos de ensaye 12x72 sin marca.
- Matraces Erlen-Meyer de 125, 250, 500, 1000 y 2000 ml. Marca Kimax®.
- Probeta graduada de 100, 500 y 800 ml. Marca Pyrex®.
- Pipeta graduada de 1, 2, 5, 10ml. Marca Pyrex®.
- Cajas petri marca Kimax®.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Asa en L de vidrio

## 7.3. MEDIOS DE CULTIVO.

- Agar Gelosa Sangre marca Bioxon®.
- Agar Infusión cerebro y corazón marca Bioxon®
- Agar Extracto de Malta marca Dibico®
- Agar nutritivo marca Bioxon®
- Caseína marca Sigma®
- Tirosina
- Xantina
- Hipoxantina
- Almidón
- Gelatina nutritiva marca Bioxon®
- Agar Citrato marca Bioxon®.
- Agar Fenilalanina marca Bioxon®.
- Caldo Rojo de metilo / Vogues-Proskauer marca Merck®.
- Esculina
- Indol
- lisozima

- Agar – Agar marca Dibico®.

Azúcares marcas (Sigma® o BD®)

- Arabinosa
- Fructosa
- Galactosa
- Glicerol
- Glucosa
- Inositol.
- Maltosa
- Manitol.
- Manosa
- Ramnosa.
- Ribosa
- Sacarosa
- Sorbitol
- Trealosa
- Xilosa

Aminoácidos marcas Sigma® o BD®

- Alanina
- Arginina
- Asparagina
- Cisteína
- Fenilalanina
- Glicina
- Histidina
- Metionina
- Ornitina
- Serina

#### Ácidos orgánicos

- Acido benzoico
- Ácido butírico
- Ácido cítrico
- Ácido láctico
- Ácido fumárico
- Acido hipúrico
- Ácido malónico
- Ácido succínico
- Acido tartárico

#### 7.4. EQUIPO.

- Incubadora marca Felisa<sup>®</sup>.
- Refrigerador General Electric<sup>®</sup> modelo turbo plus cooling system.
- Autoclave de calor húmedo marca Presto Steele<sup>®</sup> modelo 21lt.
- Termo baño marca CIVEQ<sup>®</sup> modelo HH-1.
- Estufa de gas marca SAN-SON<sup>®</sup>.
- Microscopio óptico marca Carl Zeiss<sup>®</sup> modelo Stanford 25.
- Micropipetas marca Biohit<sup>®</sup> de 10 a 100µl.
- Micropipetas marca RAININ<sup>®</sup> de 0.1 a 2 µl, 0.5 a 10 µl, 1 a 20 µl, 20 a 200 µl, 100 a 1000 µl.
- Mechero tipo Fisher.
- Balanza analítica marca OHAUS<sup>®</sup> modelo Adventurer.
- Microondas marca Magic Chef<sup>®</sup>.

#### 7.5. REACTIVOS.

- p-fenilendiaminobenzaldehído
- Alcohol amílico
- Ácido clorhídrico concentrado
- Cloruro de sodio

- Fosfato de potasio
- Cloruro de potasio
- Etanol
- Citrato férrico
- Cloruro de sodio
- Fosfato de amonio di básico
- Ácido clorhídrico
- Sulfato de magnesio.7H<sub>2</sub>O
- Nitrato de potasio
- Fosfato di amónico
- Fosfato mono potásico

#### **7.6. INSUMOS.**

- Hisopos de algodón.
- Astillas de madera.
- Puntas amarillas para micro pipeta 100 µl
- Puntas azules para 100 µl
- Parafilm marca SPI SUPPLIES®
- Agua destilada

## 8. METODOLOGÍA.

### 8.1. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 8.1.1. MUESTREO.

Se realizaron muestreos en los 50 metros previos a la caída de la cascada de “Chorro Prieto” en Ichaqueo Michoacán, se recolectaron un total de 8 muestras provenientes del sedimento de este cause en frascos estériles y se colocaron en un recipiente de aislamiento térmico con geles en congelación para evitar lo más posible la variación de temperatura y pH de su sitio original (las cuales se muestran en la tabla 2) y una hora después de la recolección las muestras fueron colocadas en refrigeración para su posterior tratamiento.

# DE MUESTRA	TEMPERATURA (°C)	pH
M1	13.5	7.5
M2	13.0	7.6
M3	13.0	7.8
M4	12.9	7.3
M5	13.2	7.5
M6	12.7	7.4
M7	13.7	7.8
M8	13.3	7.6

### 8.1.2. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

La muestra fue puesta en contacto con SDS 3% y extracto de levadura 3% a 40°C de la siguiente forma:

- Se colocaron 2 ml de agua en un tubo de ensaye y en otro tubo se colocó lo equivalente de sedimento (esto se realizó para cada muestra) completándose hasta el equivalente a 10 ml para tener una dilución  $10^{-1}$ .
- Se realizó una segunda dilución  $10^{-2}$  tomando 100  $\mu$ l de la dilución de la muestra y se le adicionaron 900 $\mu$ l de una solución de extracto de levadura al 3% y SDS 3%. Una vez mezclados se incubaron en baño maría por 20 minutos a 40°C.
- Se tomaron 30 $\mu$ l de la dilución y se colocaron sobre placas de agar sangre y agar infusión cerebro y corazón (BHI), realizando una siembra masiva con asa en forma de "L".
- Se incubó a 37°C por 72 horas, realizando cada 24 horas por 7 días una revisión del crecimiento de las cepas obtenidas.
- Se seleccionaron las cepas características de actinomicetos y se re-aislaron en un medio de cultivo más selectivo para actinomicetos como lo es el extracto de malta, en el cual el crecimiento fue más rápido y abundante que en los medios antes utilizados por lo que se estableció como el medio de cultivo de preferencia.

## 8.2. DETERMINACIÓN DE CARACTERÍSTICAS MORFOLOGICAS

La selección de cepas de actinomicetos se realizó considerando las características definidas de morfología colonial y morfología microscópica.

### Morfología colonial

La selección de las colonias estuvo basada en la presencia o ausencia de micelio aéreo, así como colonias no cremosas, algunas con textura dura y en algunos casos fijas en el agar, considerando al mismo tiempo características como, tamaño, color, forma, textura y presencia de pigmento difusible en el agar que pudieran ser características de las colonias de actinomicetos.

### Morfología microscópica

A las colonias seleccionadas se les realizó la tinción de Gram y de Zielh Neelsen, se seleccionaron las cepas que presentaran células filamentosas, bacilares y en algunos casos cocoidales con presencia de ramificaciones, así como la presencia de esporas, la forma y tipo de agrupación de las mismas, considerando también su afinidad tintorial y ácido-alcohol resistencia.

## 8.3. COLECCIÓN DE ACTINOMICETOS.

Las cepas de actinomicetos fueron sembradas en caja y tubo, de donde se procedió a la realización de las pruebas correspondientes para su caracterización.

## 8.4. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

Se realizó un estudio de las características fenotípicas de las cepas seleccionadas, el cual se basó en la realización de pruebas bioquímicas y nutricionales.

### **8.5. CONSERVACIÓN ADECUADA DE CEPAS**

La crio-congelación es uno de los métodos de mantenimiento más empleados, porque se logran los periodos de conservación más largos. Existen algunas sustancias como el glicerol, que ayudan a proteger a los microorganismos durante el proceso de congelación; se conocen como crio-protectores. La congelación se efectúa en congeladores mecánicos, a temperaturas entre  $-50^{\circ}\text{C}$  y  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Todas las cepas utilizadas en esta investigación se conservaron llevando a cabo la técnica de crio congelación la cual consistió en cortar una pequeña porción de crecimiento de la cepa en agar extracto de malta y depositarla en criotubos; adicionándole a estos 5 ml de caldo de malta con 20% de glicerol, posteriormente se almacenan en congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### **8.6. ELABORACIÓN DE UNA BASE DATOS PARA CONFORMAR UN CATÁLOGO DE CEPAS DE ACTINOMICETOS AISLADOS DEL SEDIMENTO DE ICHAQUEO MICHOACÁN**

En la colecta de cepas se realizó una identificación preliminar de las características morfológicas tanto micro como macroscópica, se recabaron también así los datos de las pruebas bioquímicas y nutricionales realizadas.

## 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 9.1. MORFOLOGIA Y METABOLISMO BIOQUÍMICO

#### 9.1.1. MORFOLÓGIA

A continuación se muestran las características morfológicas de cada cepa aislada así como su descripción:

##### 1. CEPA U-NICOC2

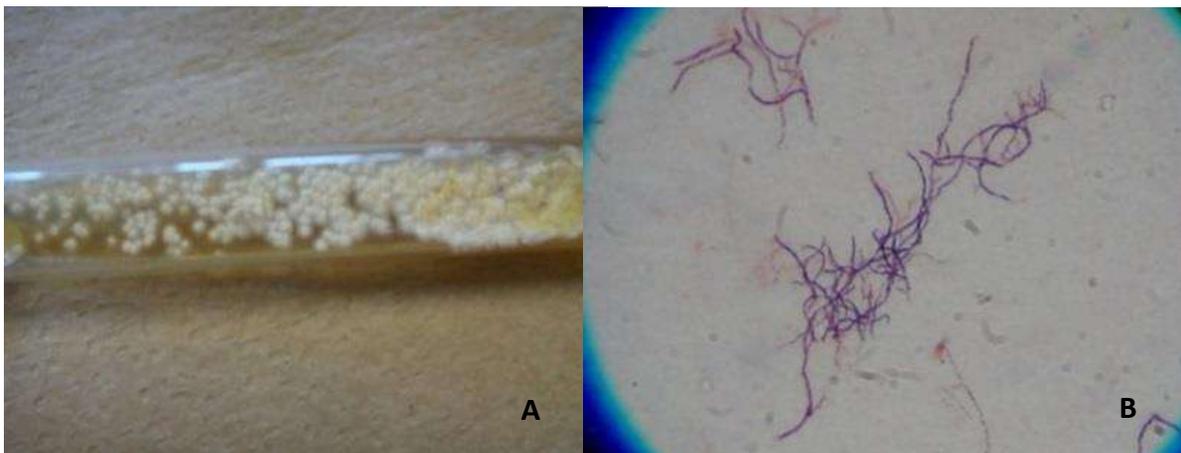


Figura 4. A) aislado U-NICOC2 colonias blancas, duras, micelio y producción de metabolitos en Agar extracto de malta. B) tinción Gram filamentos largos y fragmentados con ramificaciones Gram + (observado a 100x)

##### 2. CEPA U-NICOC61

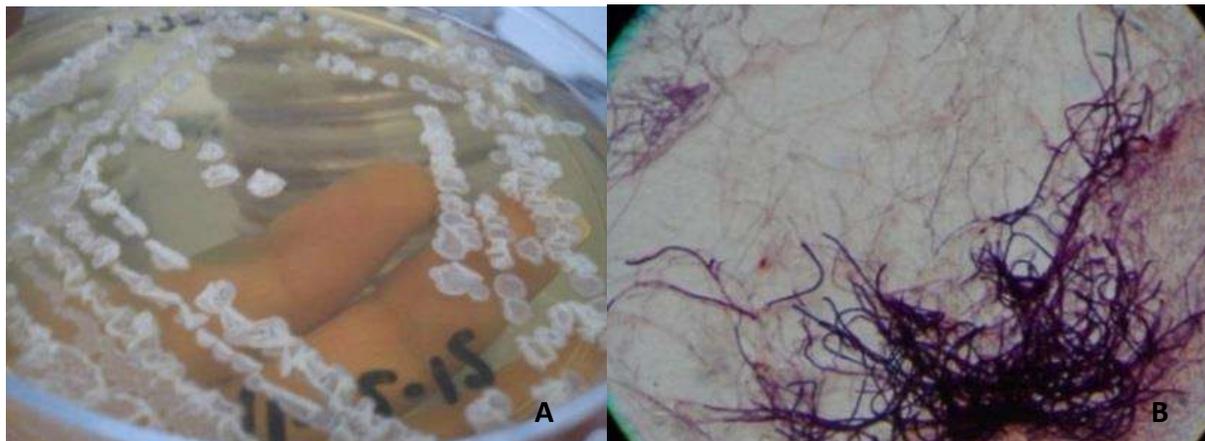


Figura 5. A) aislado U-NICOC61 Colonias beige mate, irregulares y planas en Agar extracto de malta. B) tinción Gram filamentos delgados, largos con ramificaciones Gram + (observado a 100x)

### 3. CEPA U-NICOC62

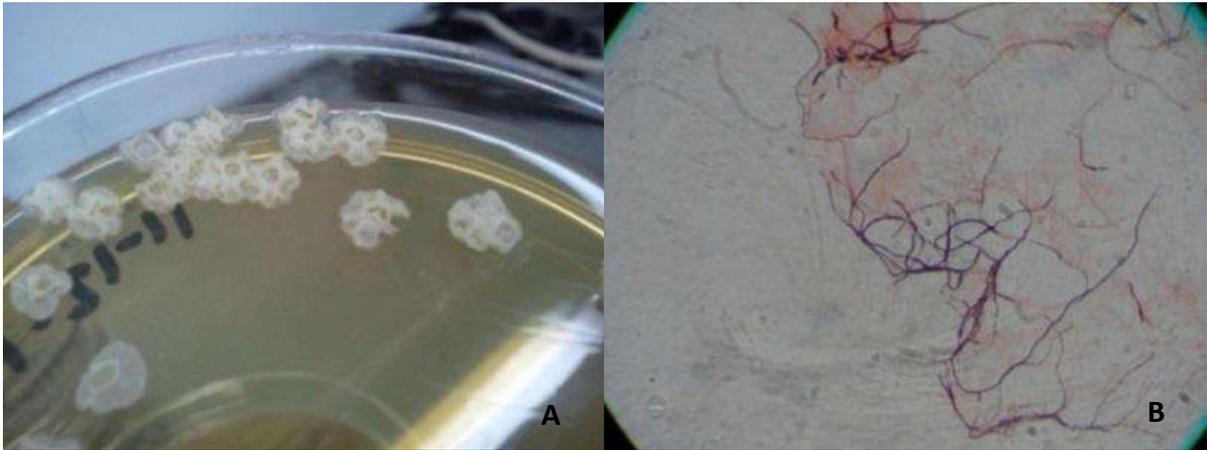


Figura 6. A) aislado U-NICOC62 Colonias beige mate, irregulares y rugosas en Agar extracto de malta. B) tinción Gram filamentos delgados, largos con ramificaciones Gram + (observado a 100x)

### 4. CEPA U-NICOC7

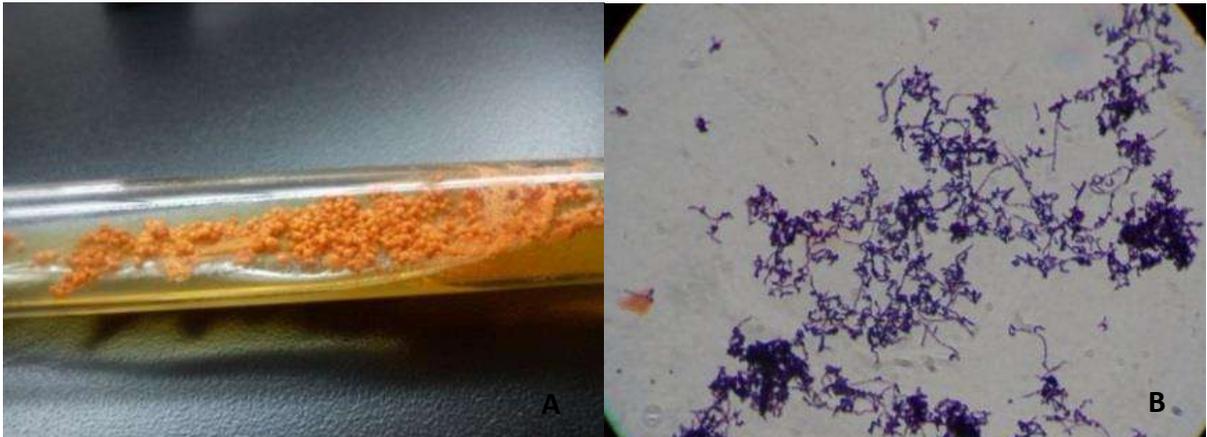


Figura 7. A) aislado U-NICOC7 Colonias esféricas, naranjas, cremosas con micelio y suaves. en Agar extracto de malta. B) tinción Gram Filamentos fragmentados dando lugar a cocos o bacilos Gram + (observado a 100x)

## 5. CEPA U-NICOC8

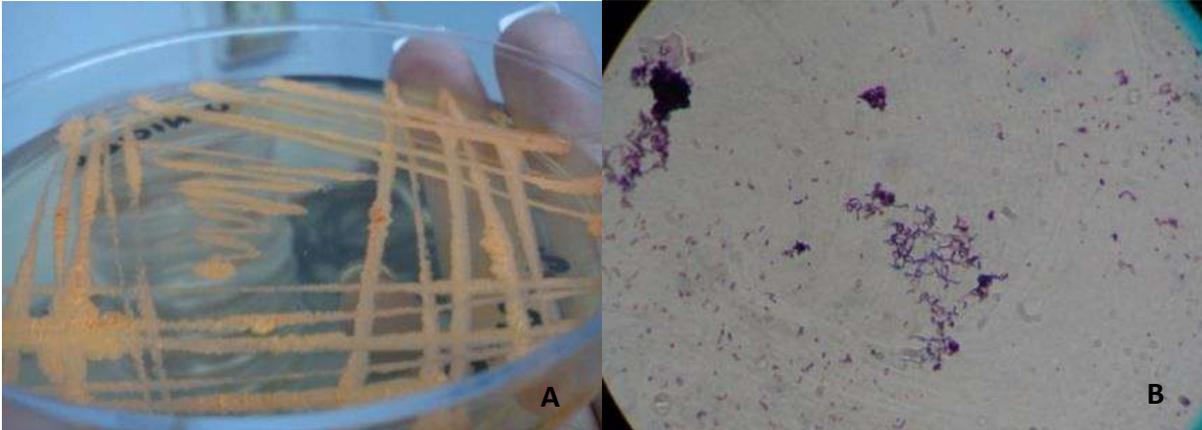


Figura 8. A) aislado U-NICOC8 Colonias esféricas, naranjas salmón mate con micelio y suaves. en Agar extracto de malta. B) tinción Gram Filamentos fragmentados dando lugar a cocos o bacilos Gram + (observado a 100x)

## 6. CEPA U-NICOC10

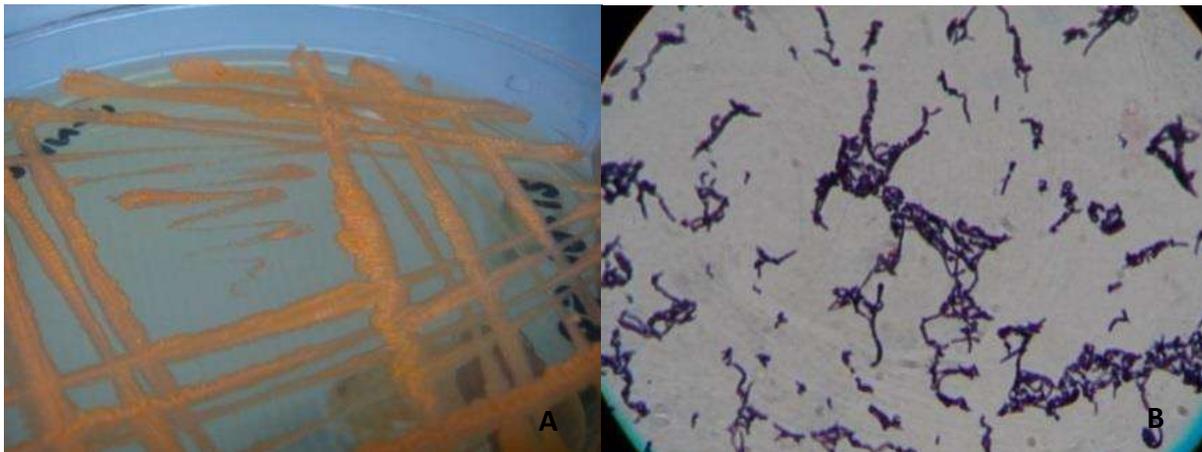


Figura 9. A) aislado U-NICOC10 Colonias de naranjas, convexas, formando rugosidades en Agar extracto de malta. B) tinción Gram Filamentos fragmentados dando lugar a cocos o bacilos Gram + (observado a 100x)

## 7. CEPA U-NICOC10'

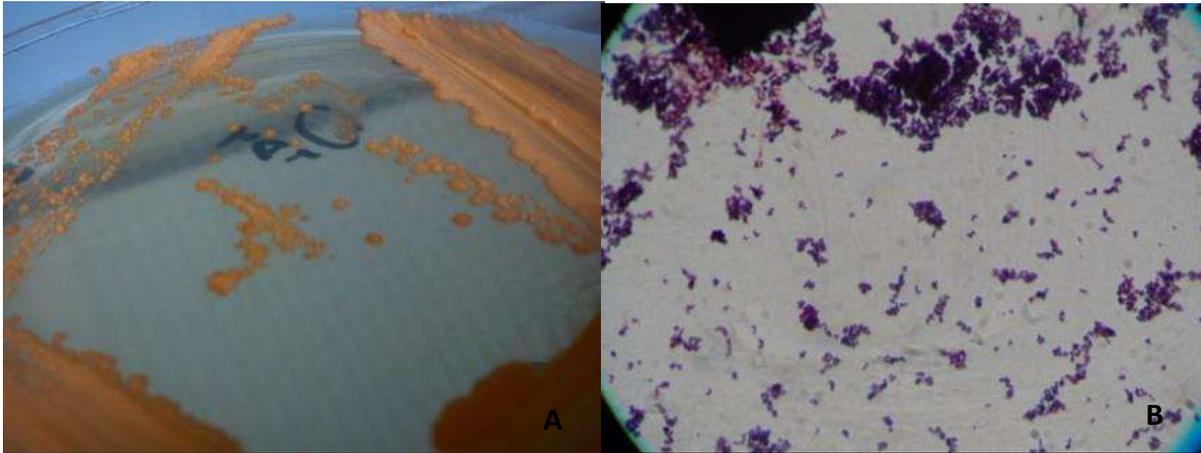


Figura 10. A) aislado U-NICOC10' Colonias esféricas, cremosas de color naranja en Agar extracto de malta. B) tinción Gram Filamentos fragmentados dando lugar a cocos o bacilos Gram + (observado a 100x)

## 8. CEPA U-NICOC11



Figura 11. A) aislado U-NICOC11 Colonias blancas, rugosas, convexas, mate, duras con micelio en Agar extracto de malta. B) tinción Gram Filamentos largos muy ramificados Gram + (observado a 100x)

## 9. CEPA U-NICOC12

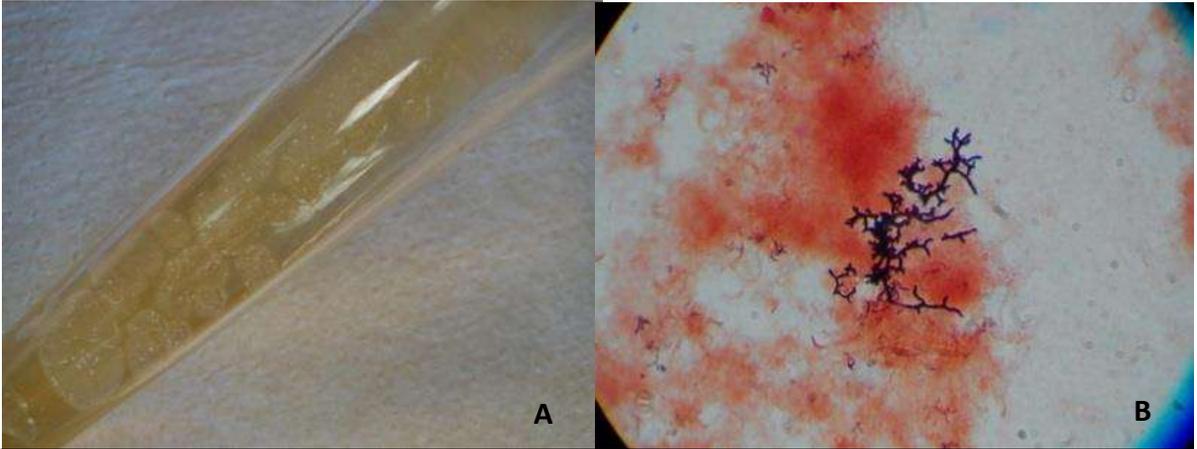


Figura 12. A) aislado U-NICOC12 Colonias beige brillantes, irregulares, convexas y con pliegues en Agar extracto de malta. B) tinción Gram Filamentos con ramificaciones cortas Gram + (observado a 100x)

## 10. CEPA U-NICOC13A

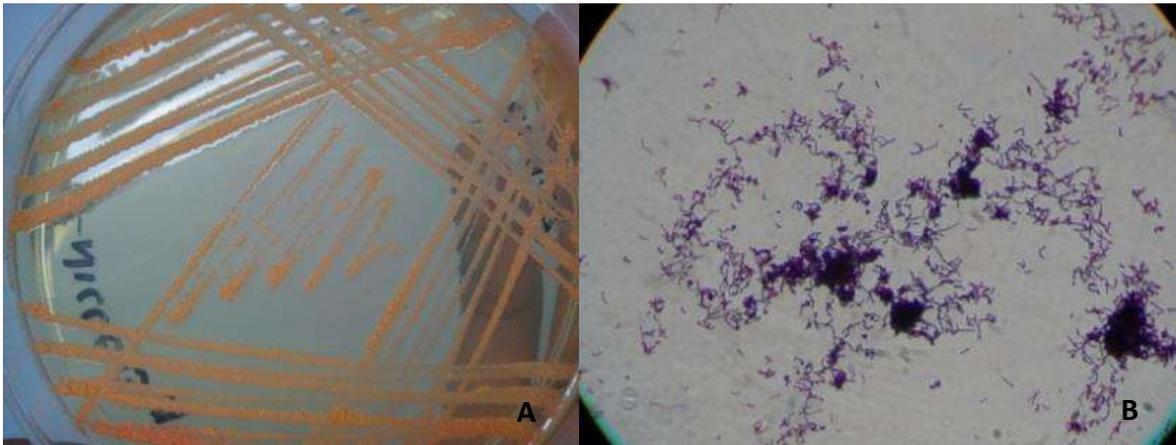


Figura 13. A) aislado U-NICOC13A Colonias naranjas, consistencia cremosa, suave y circulares en Agar extracto de malta. B) tinción Gram Filamentos fragmentados dando lugar a cocos o bacilos Gram + (observado a 100x)

## 11. CEPA U-NICOC15

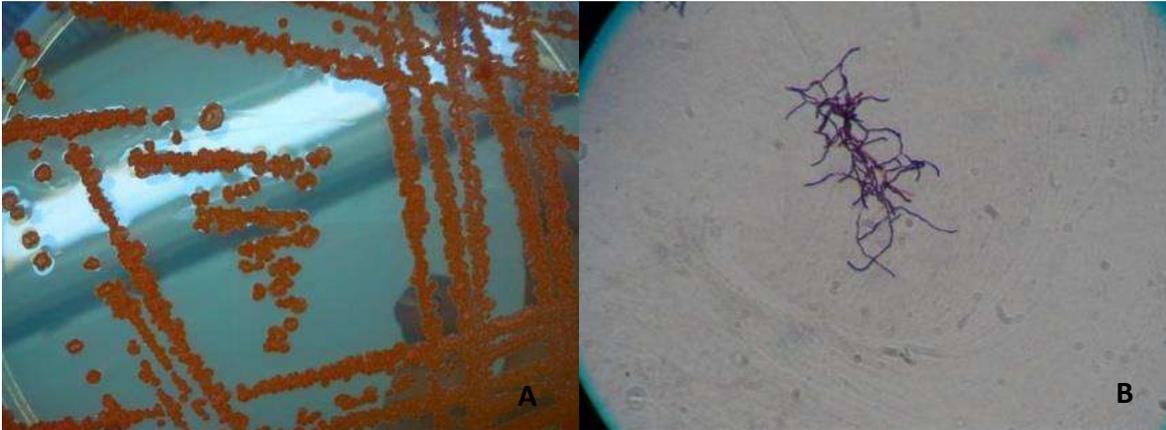


Figura 14. A) aislado U-NICOC15 Colonias rojas, pequeñas con consistencia blanda y convexas en Agar extracto de malta. B) tinción Gram Filamentos con pequeñas ramificaciones Gram + (observado a 100x)

## 12. CEPA U-NICOC22

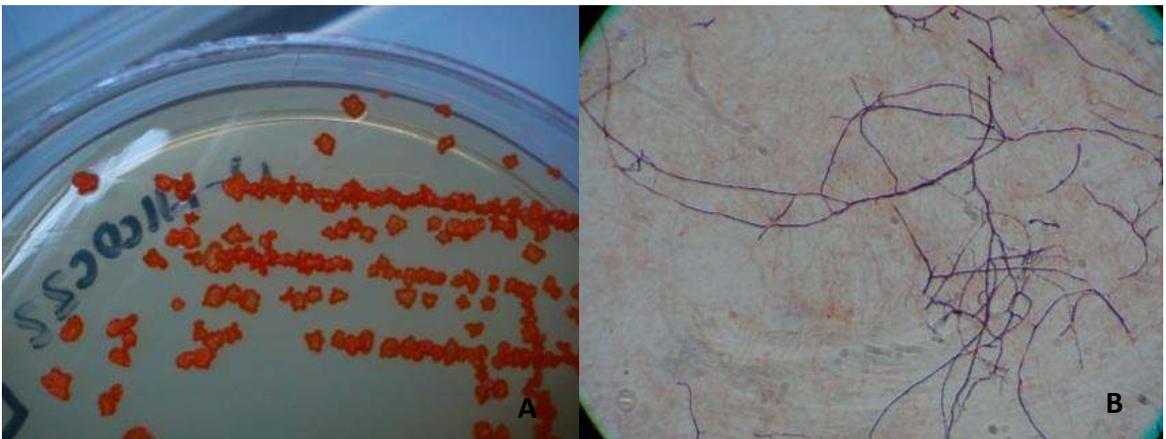


Figura 15. A) aislado U-NICOC22 Colonias rojas, pequeñas, suaves, circulares, convexas en Agar extracto de malta. B) tinción Gram Filamentos delgados, ramificados Gram + (observado a 100x)

### 13. CEPA U-NICOC23

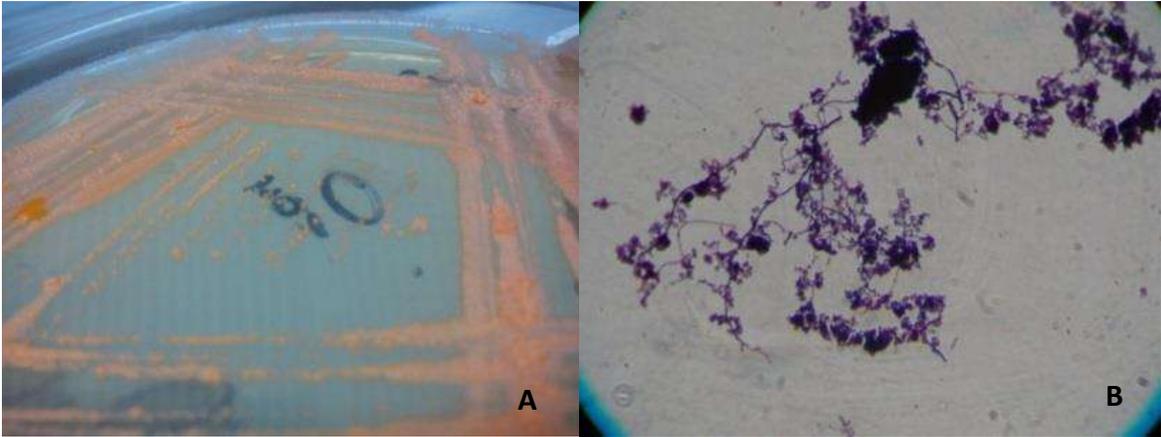


Figura 16. A) aislado U-NICOC23 Colonias naranjas, circulares, suaves, convexas, con pliegues en Agar extracto de malta. B) tinción Gram Filamentos fragmentados dando lugar a cocos o bacilos Gram + (observado a 100x)

### 14. CEPA U-NICOC24

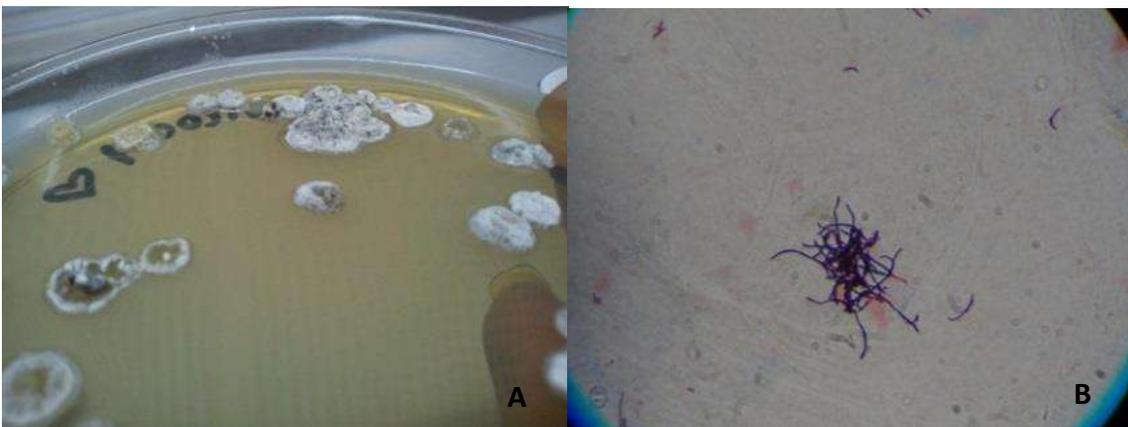


Figura 17. A) aislado U-NICOC24 Colonias beige, que al paso del tiempo se vuelven blancas, son circulares, duras y tienen micelio. en Agar extracto de malta. B) tinción Gram Filamentos pequeños aglomeradas Gram + (observado a 100x)

### 15. CEPA U-NICOC26B

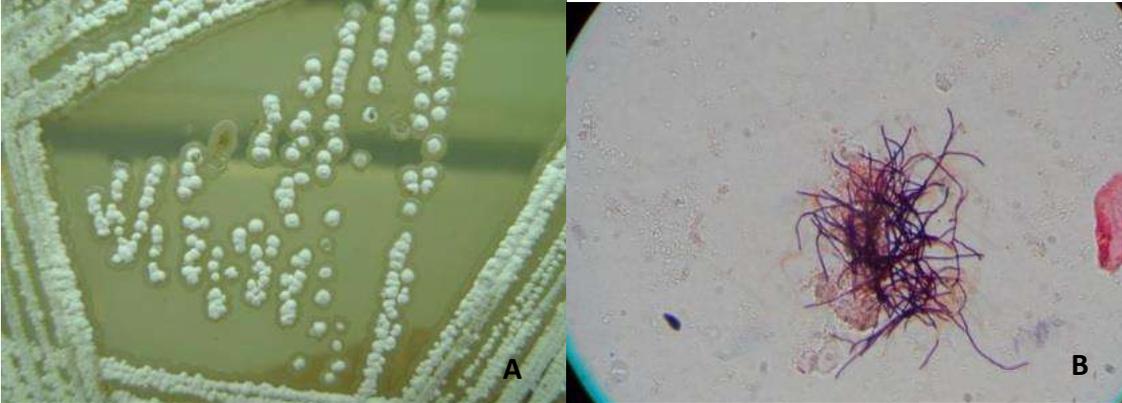


Figura 18. A) aislado U-NICOC26B Colonias beige que con el paso del tiempo se vuelven blancas, son rugosas y presentan micelio en Agar extracto de malta. B) tinción Gram Filamentos largos, aglomerados Gram + (observado a 100x)

### 16. CEPA U-NICOC26R1

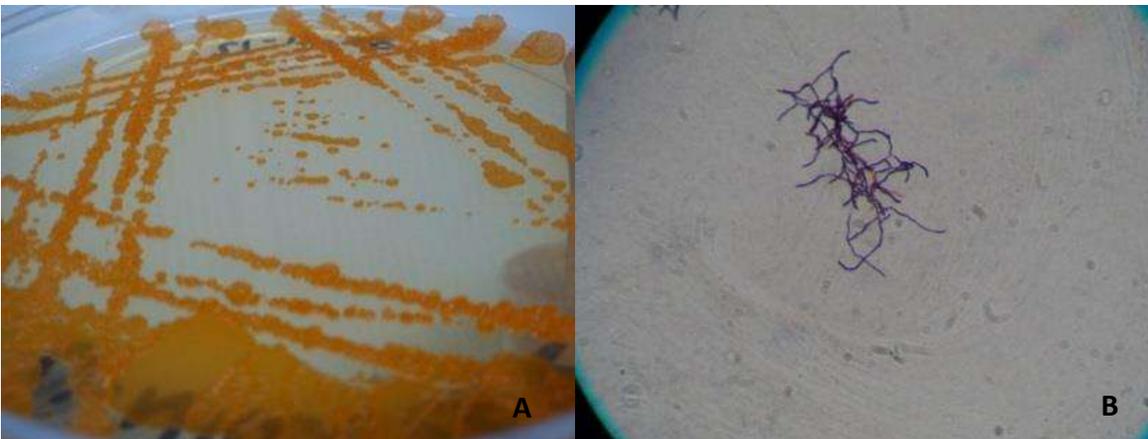


Figura 19. A) aislado U-NICOC26R1 Colonias rojas, suaves, irregulares con pliegues y sin micelio en Agar extracto de malta. B) tinción Gram Filamentos muy pequeños, aglomerados, delgados Gram + (observado a 100x)

### 17. CEPA U-NICOC26R2

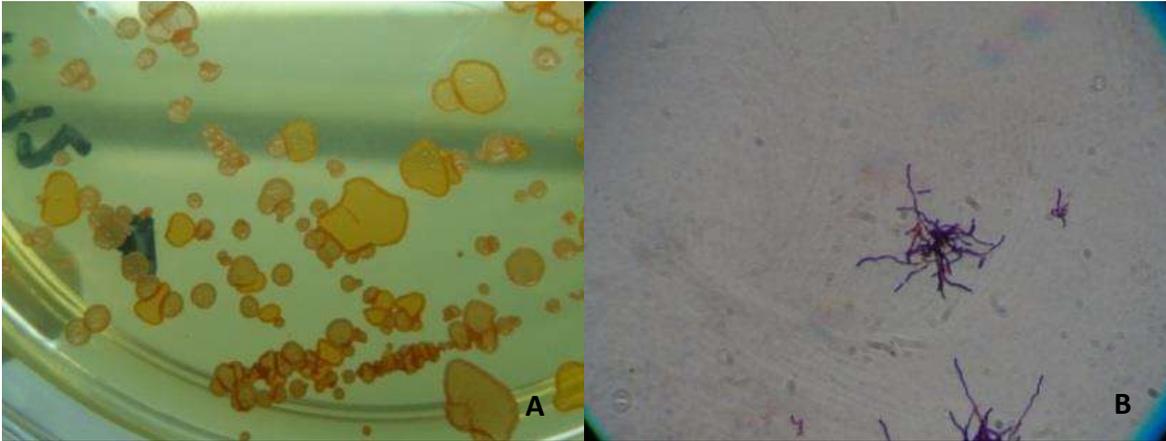


Figura 20. A) aislado U-NICOC26R2 Colonias rojo intenso, suaves y regulares en Agar extracto de malta. B) tinción Gram Filamentos delgados, ramificados Gram + (observado a 100x)

### 18. CEPA U-NICOC28

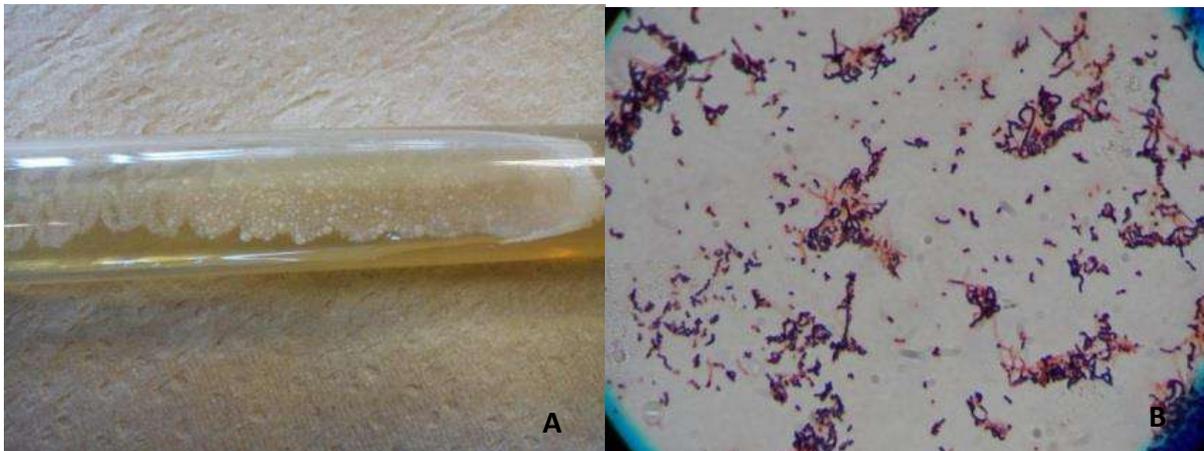


Figura 21. A) aislado U-NICOC28 Colonias beige, suaves, cremosas, sin micelio ni elevación.en Agar extracto de malta. B) tinción Gram Filamentos cortos, delgados Gram + (observado a 100x)

### 19. CEPA U-NICOC301

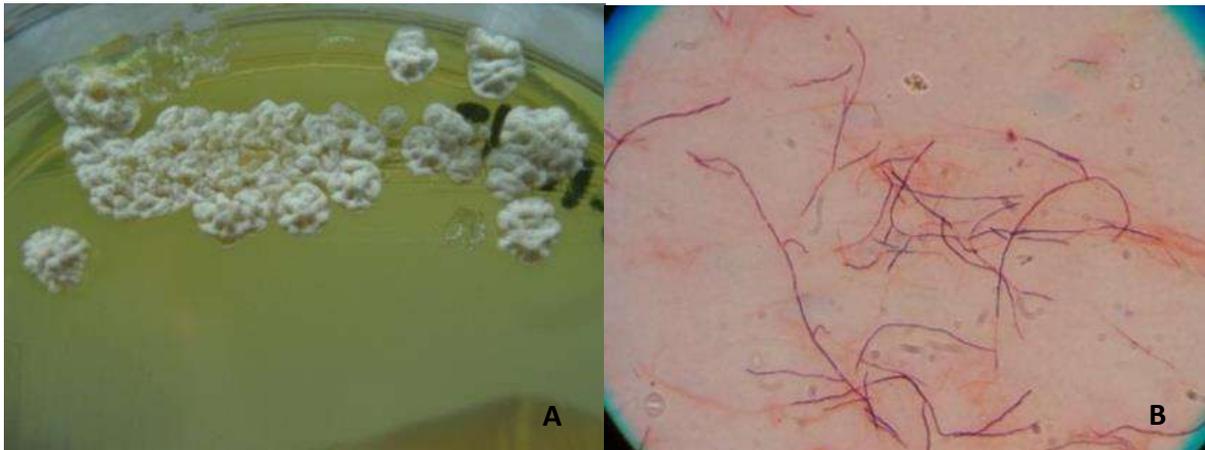


Figura 22. A) aislado U-NICOC301 colonias blancas, duras, irregulares y presentan micelio en Agar extracto de malta. B) tinción Gram filamentos largos, delgados con pocas ramificaciones Gram + (observado a 100x)

### 20. CEPA U-NICOC302

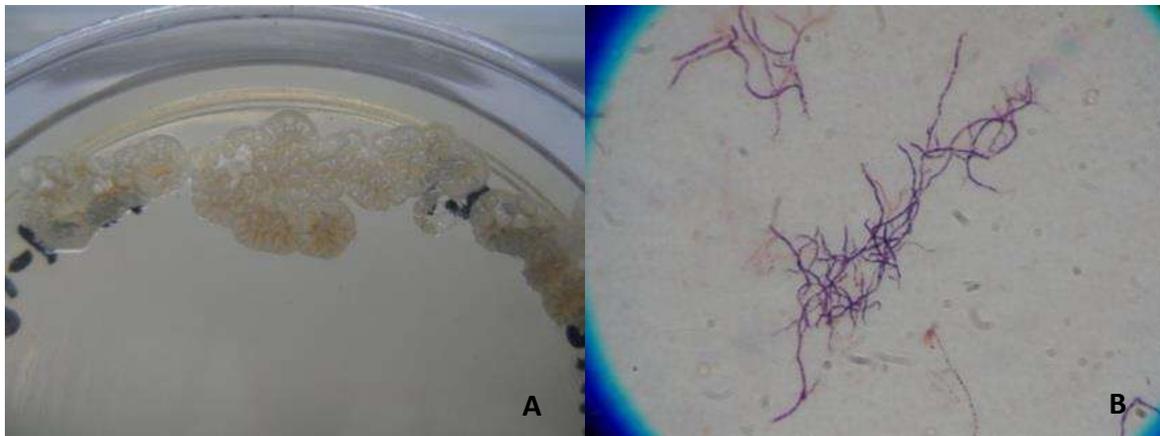


Figura 23. A) aislado U-NICOC302 Colonias beige que cambian a blancas, irregulares y duras en Agar extracto de malta. B) tinción Gram filamentos delgados, largos en ramificaciones Gram + (observado a 100x)

## 21. CEPA U-NICOC303

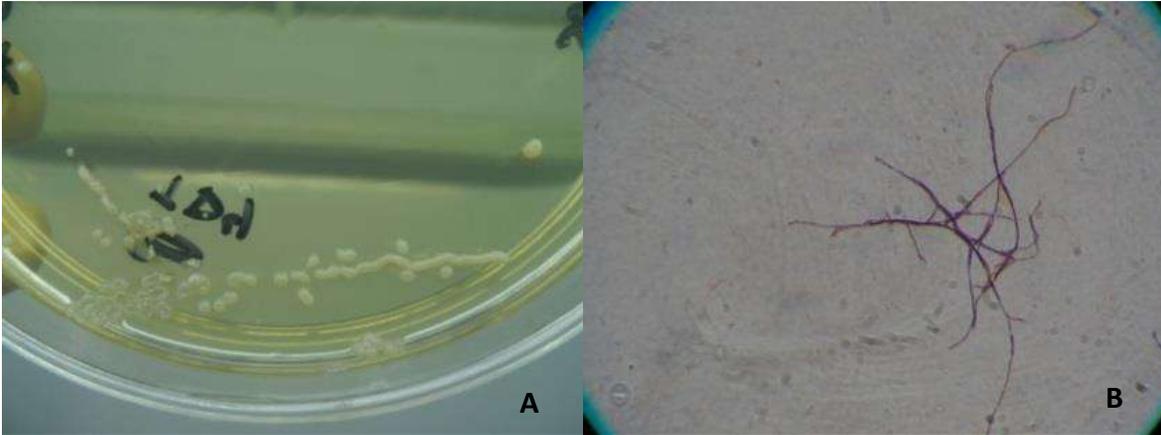


Figura 24. A) aislado U-NICOC303 colonias beige, con borde regular y consistencia dura en Agar extracto de malta. B) tinción Gram filamentos largos, delgados y ramificados Gram + (observado a 100x)

## 22. CEPA U-NICOC304

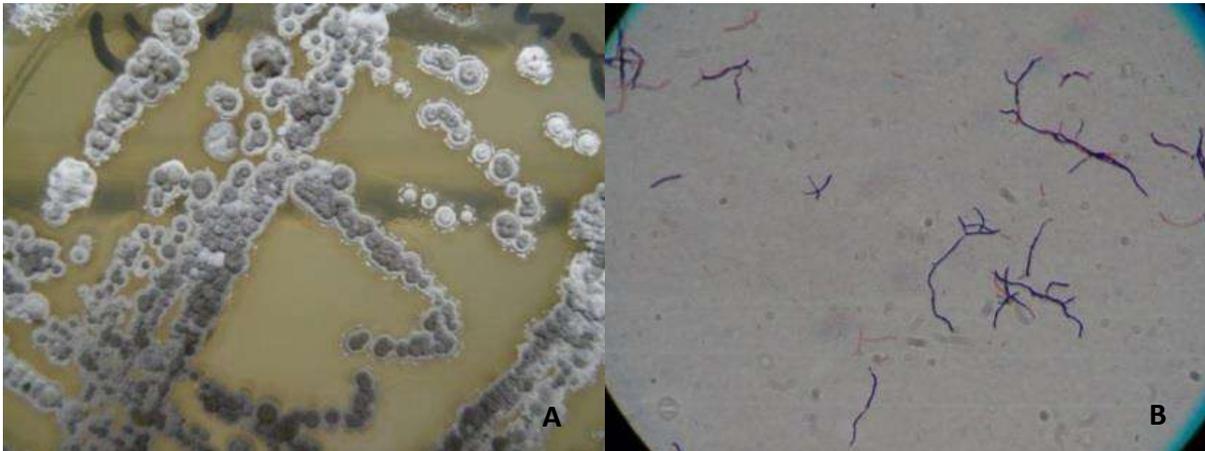


Figura 25. A) aislado U-NICOC305 Colonias blancas, duras, con bordes regulares y micelio en Agar extracto de malta. B) tinción Gram hifas cortas, ramificadas Gram + (observado a 100x)

### 23. CEPA U-NICOC305

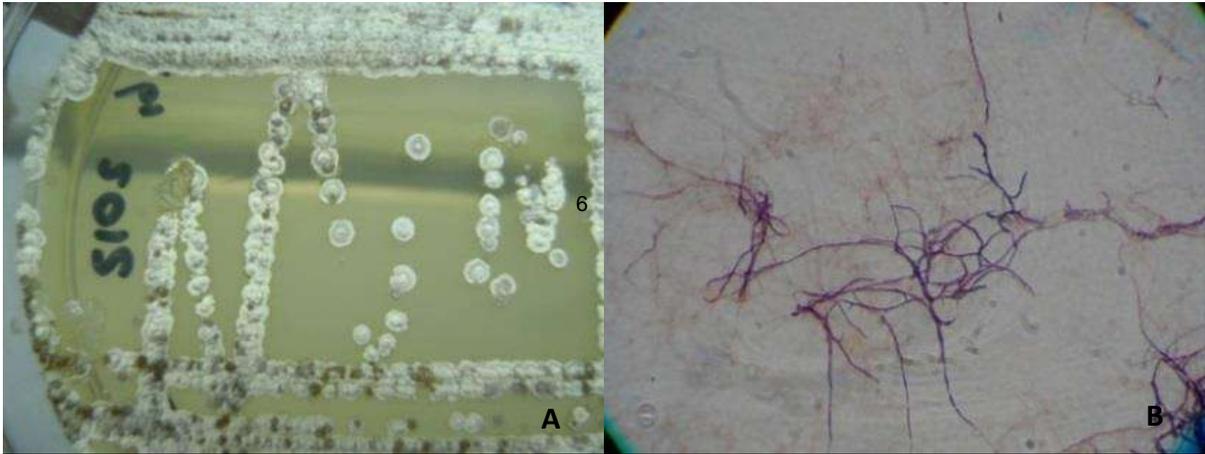


Figura 26. A) aislado U-NICOC305 colonias blancas, circulares, duras, de borde regular y micelio en Agar extracto de malta. B) tinción Gram hifas largas, delgadas, ramificadas Gram + (observado a 100x)

### 24. CEPA U-NICOC308

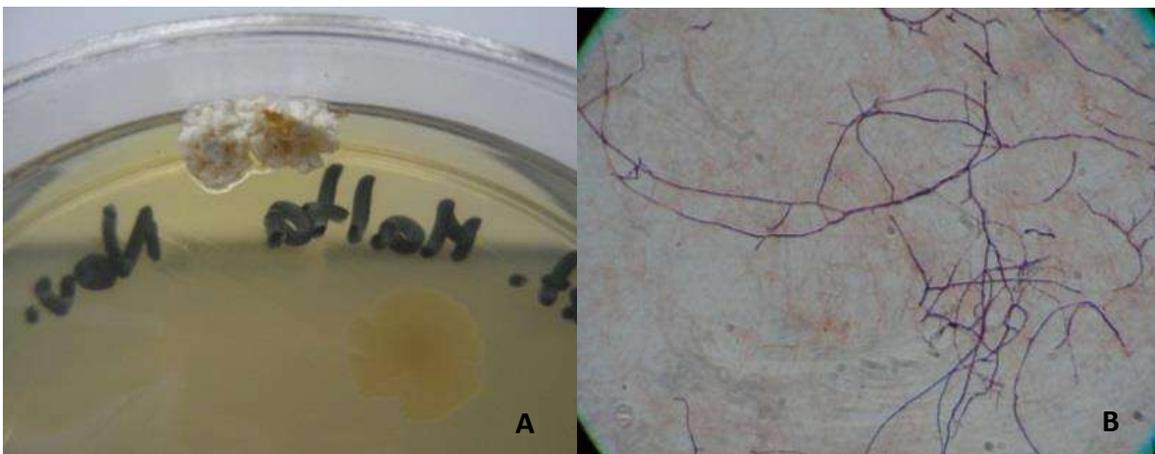


Figura 27. A) aislado U-NICOC308 colonias blancas, irregulares, elevadas con micelio en Agar extracto de malta. B) tinción Gram hifas largas, delgadas, ramificadas Gram + (observado a 100x)

## 25. CEPA U-NICOC309

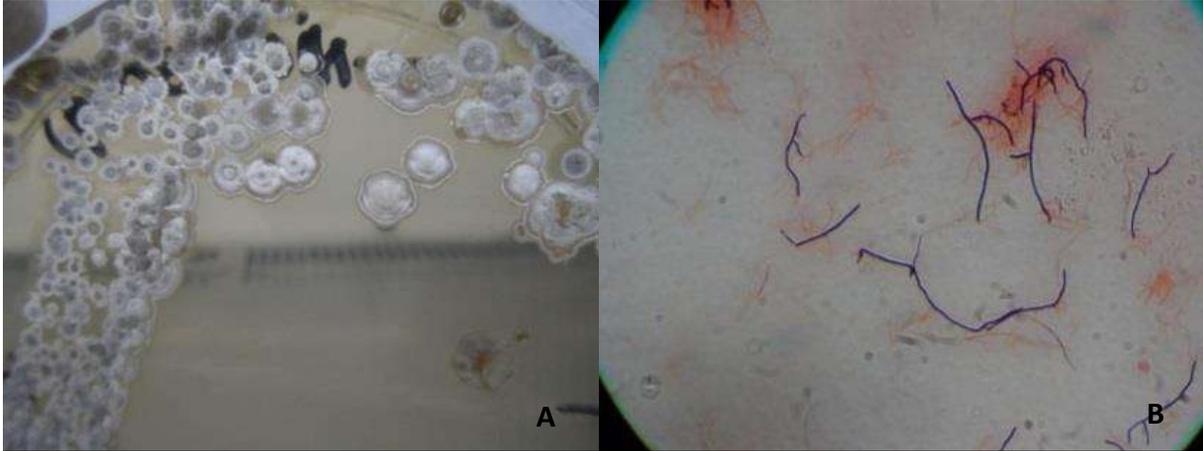


Figura 28. A) aislado U-NICOC309 colonias blancas, circulares, borde regular y micelio en Agar extracto de malta. B) tinción Gram ramificaciones delgadas y largas Gram + (observado a 100x)

## 26. CEPA U-NICOC310

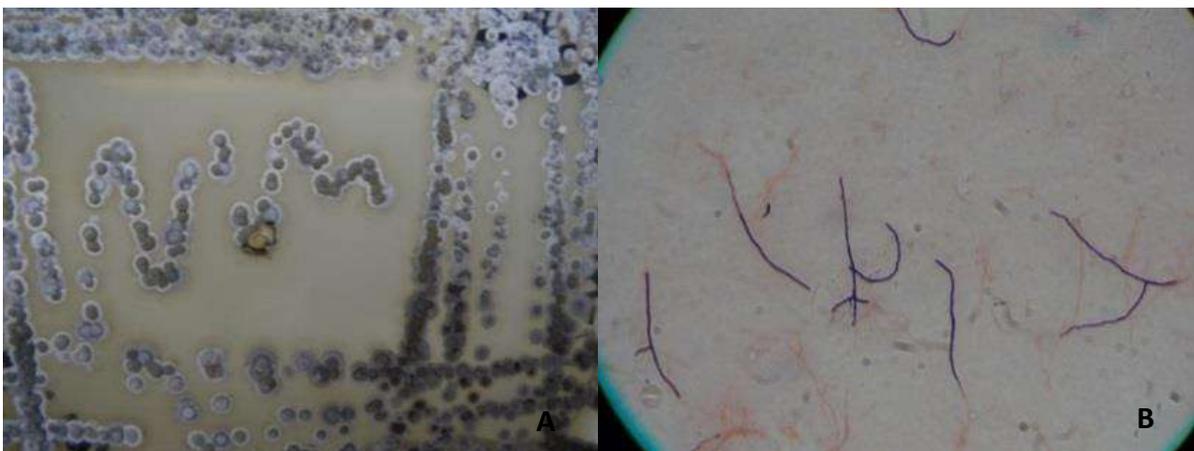


Figura 29. A) aislado U-NICOC310 colonias blancas, circulares, elevación convexa y micelio en Agar extracto de malta. B) tinción Gram ramificaciones delgadas, largas Gram+ (observado a 100x)

### 27. CEPA U- NICOC31

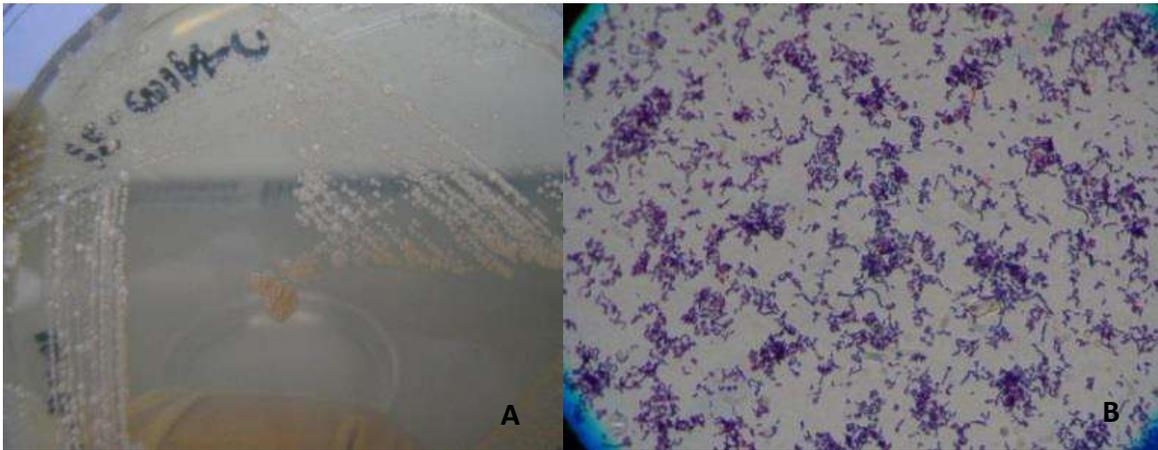


Figura 30. A) aislado U-NICOC31 Colonias beige, pequeñas, esféricas y mates.en Agar extracto de malta. B) tinción Gram Filamentos delgados, largos Gram + (observado a 100x)

### 28. CEPA U-NICOC33

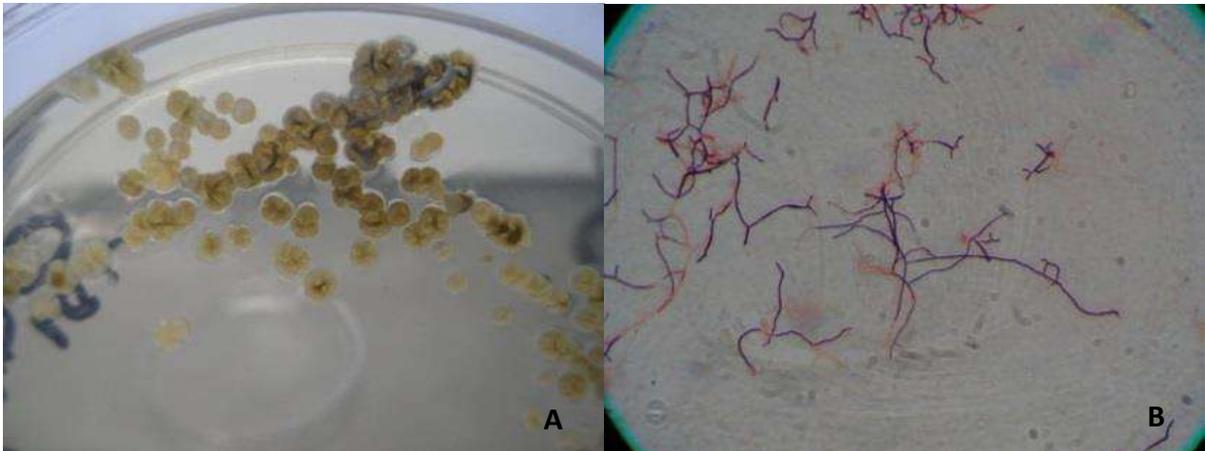


Figura 31. A) aislado U-NICOC33 Colonias beige, superficie blanquecina con micelio en Agar extracto de malta. B) tinción Gram Filamentos delgados, largos, ramificados Gram + (observado a 100x)

### 29. CEPA U-NICOC341

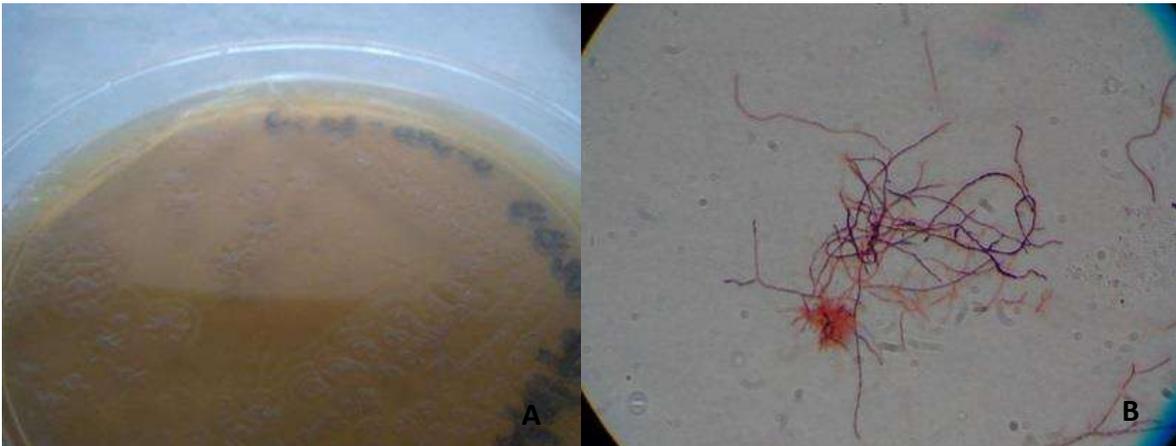


Figura 32. A) aislado U-NICOC341 Colonias rugosas, beige, brillantes con micelio en Agar extracto de malta. B) tinción Gram Filamentos delgados, largos Gram + (observado a 100x)

### 30. CEPA U-NICOC342

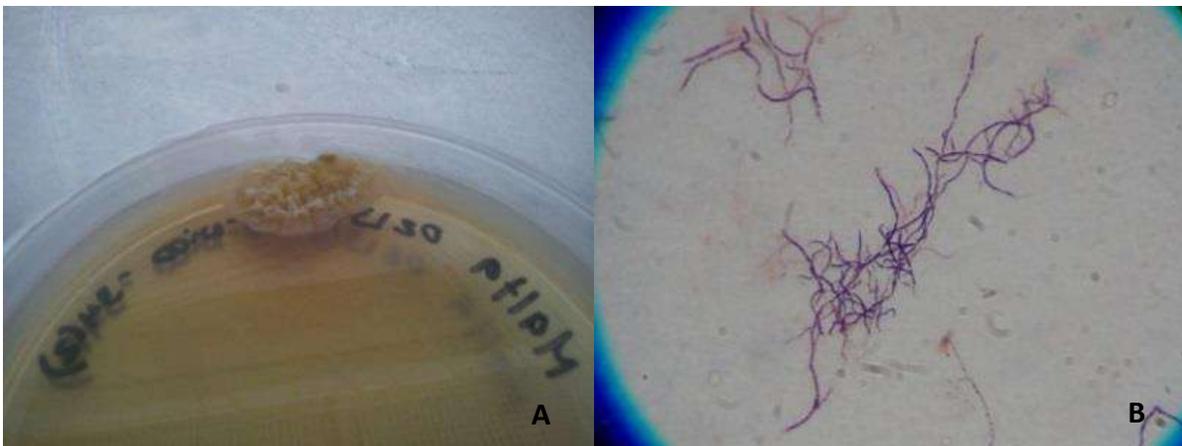


Figura 33. A) aislado U-NICOC342 colonias beige, rugosas, irregulares, con micelio en Agar extracto de malta. B) tinción Gram hifas largas, delgadas y ramificadas Gram + (observado a 100x)

### 31. CEPA U-NICOC351

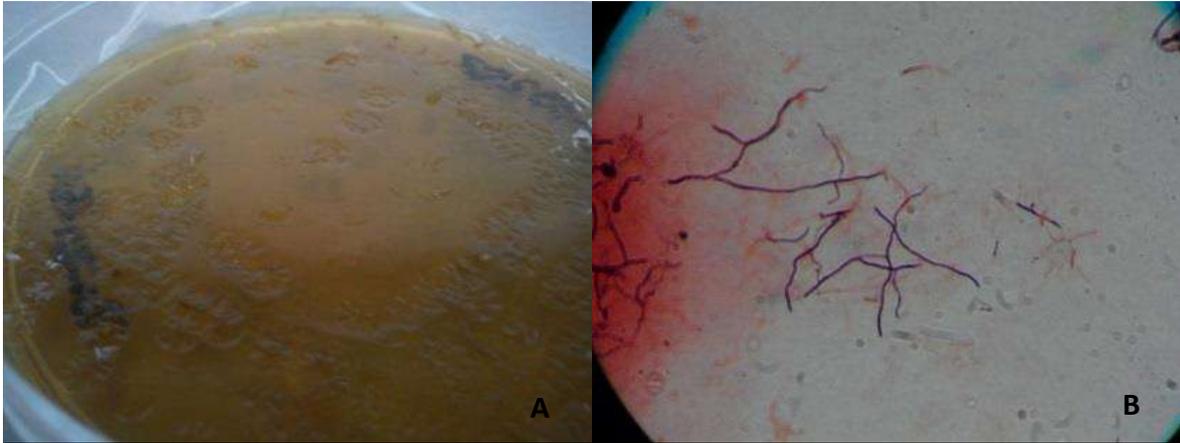


Figura 34. A) aislado U-NICOC351 colonias beige, rugosas, irregulares, con micelio y planas en Agar extracto de malta. B) tinción Gram hifas cortas, ramificadas y algunas segmentadas Gram + (observado a 100x)

### 32. CEPA U-NICOC352

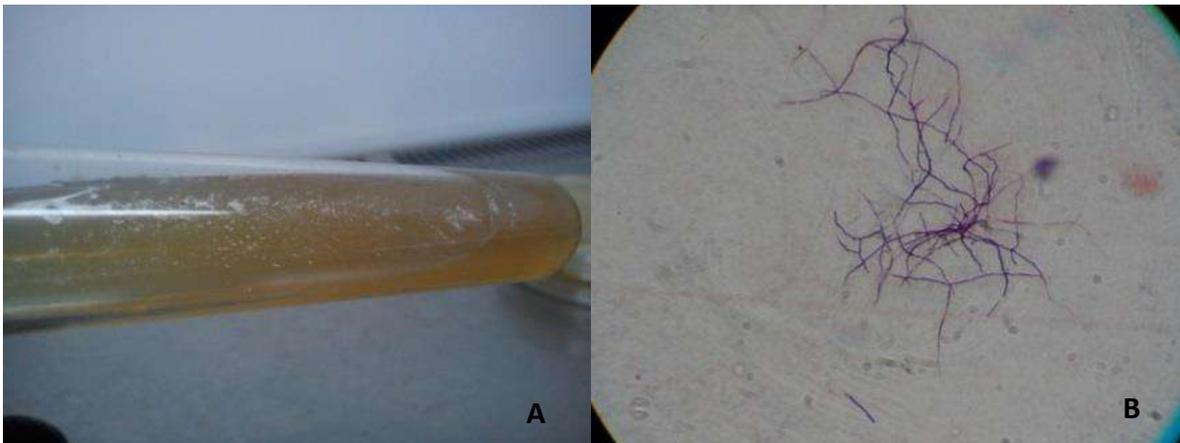


Figura 35. A) aislado U-NICOC352 colonias beige, duras, irregulares con micelio en Agar extracto de malta. B) tinción Gram hifas delgadas, ramificadas Gram + (observado a 100x)

### 33. CEPA U-NICOC37

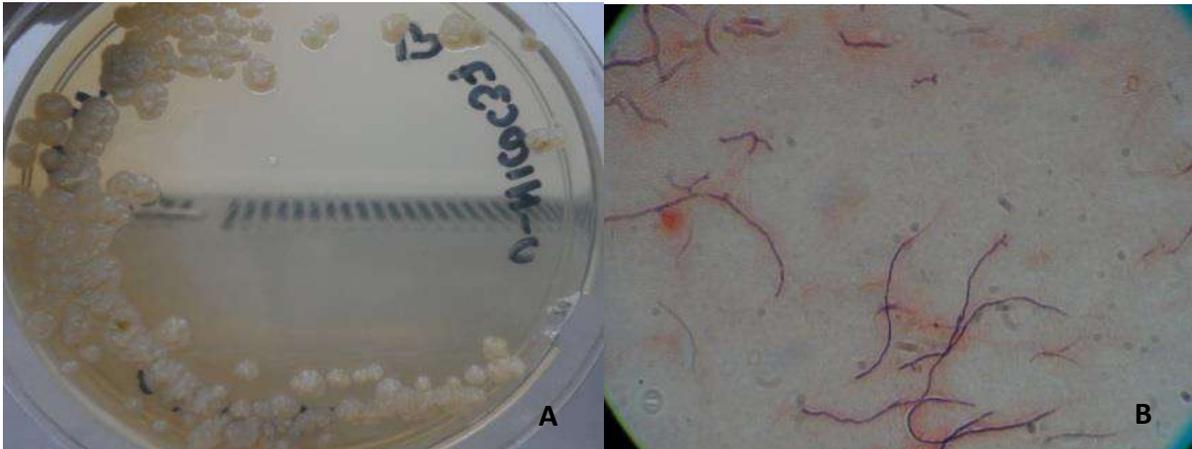


Figura 36. A) aislado U-NICOC37 colonias beige, mate, rugosas, elevadas y presentan micelio en Agar extracto de malta. B) tinción Gram filamentos delgados, largos y ramificados Gram + (observado a 100x)

### 34. CEPA U-NICO38



Figura 37. A) aislado U-NICO38 colonias pequeñas, beige, irregulares, suaves y poco micelio en Agar extracto de malta. B) tinción Gram filamentos delgados Gram + (observado a 100x)

### 35. CEPA U-NICOC39

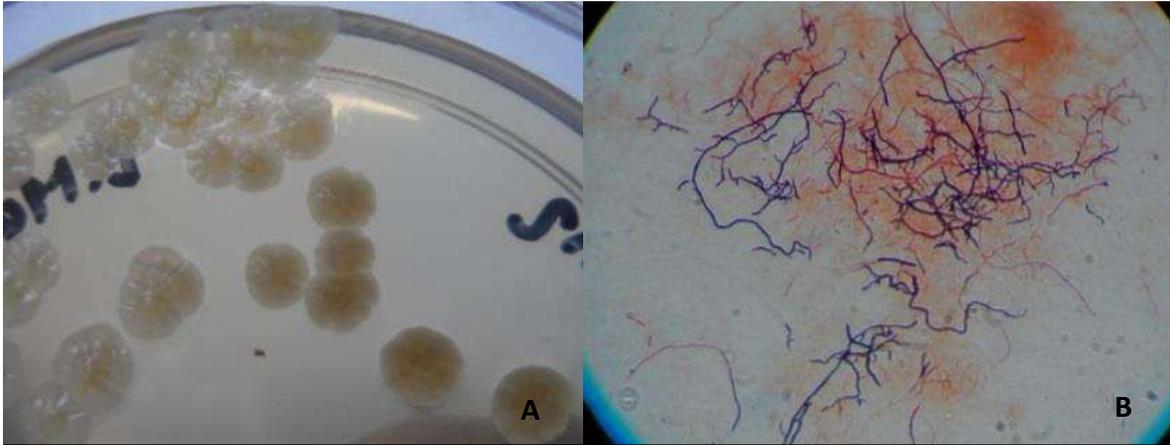


Figura 38. A) aislado U-NICOC39 colonias beige mate, rugosas, elevadas, duras y con micelio en Agar extracto de malta. B) tinción Gram filamentos cortos, ramificados Gram + (observado a 100x)

### 36. CEPA U-NICOC40

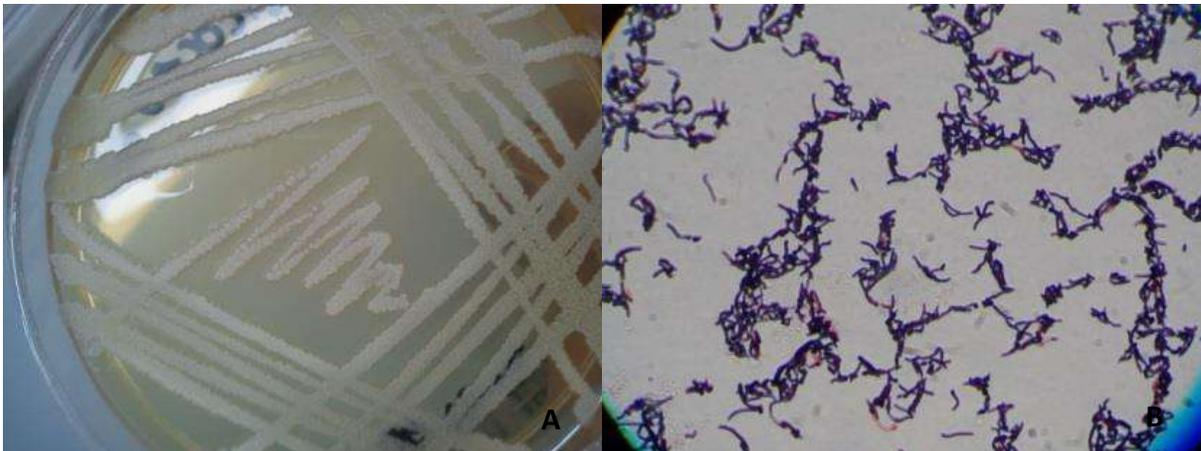


Figura 39. A) aislado U-NICOC40 colonias beige mate, suaves, cremosas, sin micelio en Agar extracto de malta. B) tinción Gram filamentos cortos, algunos segmentándose dando lugar a pequeñas estructuras bacilares Gram + (observado a

### 37. CEPA U-NICOC411



Figura 40. A) aislado U-NICOC411 colonias beige, suaves, rugosas, irregulares sin micelio en Agar extracto de malta. B) tinción Gram filamentos largos, delgados muy ramificados Gram + (observado a 100x)

### 38. CEPA U-NICOC412

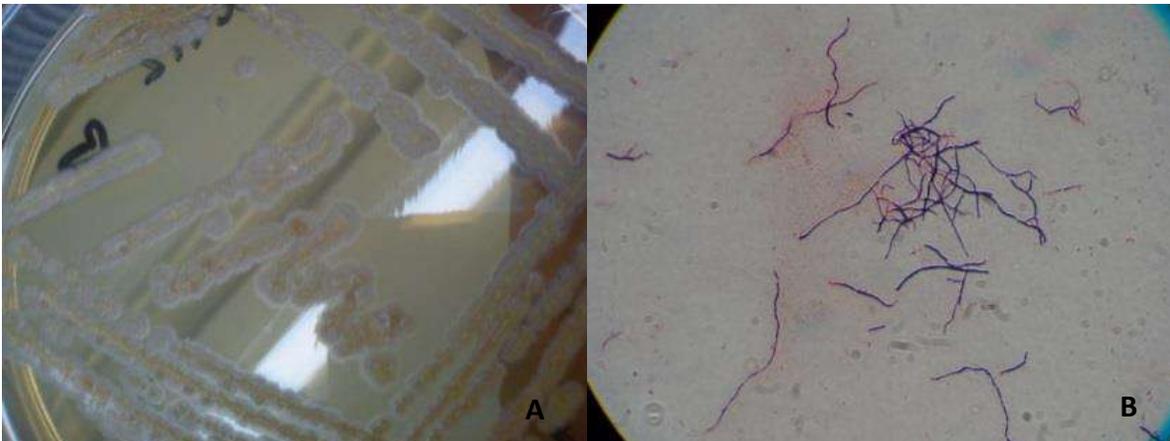


Figura 41. A) aislado U-NICOC412 colonias beige, suaves, irregulares, elevadas sin micelio en Agar extracto de malta. B) tinción Gram filamentos delgados, largos, ramificados Gram + (observado a 100x)

### 39. CEPA U-NICOC42

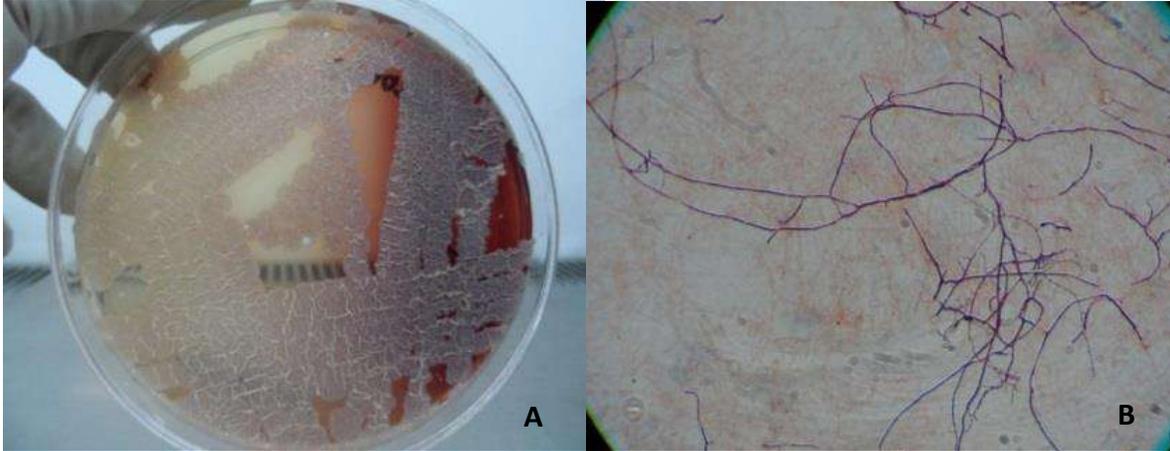


Figura 42. A) aislado U-NICOC42 colonias beige, suaves, rugosas, irregulares sin micelio en Agar extracto de malta. B) tinción Gram hifas largas, delgadas y poco ramificadas Gram + (observado a 100x)

Los resultados de la tinción Ziehl-Neelsen fueron negativos en todos los casos, es decir, que todas nuestras cepas aisladas no son BAAR.

### 9.1.2. METABOLISMO BIOQUIMICO

El análisis fenotípico realizado a las 39 cepas aisladas consistió en la realización de 14 pruebas bioquímicas, las pruebas de producción de ácidos se realizaron con 6 carbohidratos. Se probó la utilización de 20 sustratos utilizables como única fuente de carbono y energía, de los cuales fueron, 10 carbohidratos, 1 alcohol y 9 ácidos orgánicos. Finalmente se probó la utilización de 10 aminoácidos como única fuente de carbono, nitrógeno y energía.

CARACTERÍSTICAS	# DE CEPAS POSITIVAS	CARACTERÍSTICAS	# DE CEPAS POSITIVAS
Caseína	29	<b>Producción de ácidos a partir de</b>	
Tirosina	7	Ramnosa	39
Xantina	11	Glucosa	39
Hipoxantina	15	Glicerol	39
Almidón	39	Fructosa	39
Gelatina	20	Inositol	39
Esculina	29	Manitol	39
Arginina	36	<b>Pruebas nutricionales</b>	
Ornitina	34	Arabinosa	28
Rojo de metilo	21	Manitol	27
Vogues Proskauer	22	Sorbitol	28
Indol	0	Trehalosa	27
Lisozima	13	Xilosa	27
Citrato	29	Manosa	29
<b>Utilización de aminoácidos</b>		Manosa	28
Alanina	29	Maltosa	28
Arginina	30	Ribosa	28
Asparagina	35	Galactosa	29
Fenilalanina	32	Sacarosa	28
Glicina	31	Ácido benzoico	10
Histidina	34	Ácido láctico	14
Metionina	31	Ácido cítrico	12
Ornitina	30	Ácido cítrico	10
Serina	33	Ácido butírico	10
Cisteína	31	Glicerol	26
		Ácido succínico	8
		Ácido malónico	9
		Ácido hipúrico	15
		Ácido fumarico	10
		Ácido tartárico	11

Tabla 3. Pruebas utilizadas para la caracterización fenotípica de actinomicetos y el porcentaje de cepas que dieron positiva la reacción

Biodiversidad fenotípica de actinomicetos aislados de sedimento de Ichaque Michoacán

TABLA 4. PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y NUTRICIONALES REALIZADAS A CADA CEPA OBTENIDA, EL 1 EXPRESA UN RESULTADO POSITIVO Y EL 0 UNO NEGATIVO.

CEPA	CASEÍNA	TIROSINA	XANTINA	HIPOXANTINA	ALMIDÓN	GELATINA	FENILALANINA	CITRATO	ROJO DE METILO	VOGUES PROSCAUER	ESCOLINA	INDOL	LIZOSIMA	RAMNOSA	GLUCOSA	GLICEROL	FRUCTOSA	INOSITOL	MANITOL	ARGININA	ORNITINA	L-ALANINA	L-ARGININA	L-ASPARGAINA	L-FENILALANINA	GLICINA	L-HISTIDINA	L-METIONINA	L-ORNITINA	L-SERINA	L-CISTEINA	D-ARABINOSA	MANITOL	SORBITOL	TREHALOSA	XILOSA	MANOSA	MALTOSA	RIBOSA	GALACTOSA	SACAROSA	ACIDO BENZOICO	ACIDO LACTICO	ACIDO CITRICO	ACIDO BUTIRICO	GLICEROL	ACIDO SUCCINICO	ACIDO MALONICO	ACIDO HIPURICO	ACIDO FUMARICO	ACIDO TARTARICO			
A	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0				
B	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0			
C	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0		
D	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0		
E	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1		
F	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1		
G	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	
H	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
I	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
J	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
K	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
L	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
M	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
N	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
O	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Q	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
R	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
S	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
U	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Biodiversidad fenotípica de actinomicetos aislados de sedimento de Ichaque Michoacán

TABLA 4. PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y NUTRICIONALES REALIZADAS A CADA CEPA OBTENIDA, EL 1 EXPRESA UN RESULTADO POSITIVO Y EL 0 UNO NEGATIVO.

C E P A	CASEÍNA	TIROSINA	XANTINA	HIPOXANTINA	ALMIDÓN	GELATINA	FENILALANINA	CITRATO	ROJO DE METILO	VOGUES PROSCAUER	ESCULINA	INDOL	LIZOSIMA	RAMNOSA	GLUCOSA	GLICEROL	FRUCTOSA	INOSITOL	MANITOL	ARGININA	ORNITINA	L-ALANINA	L-ARGININA	L-ASPARGAINA	L-FENILALANINA	GLICINA	L-HISTIDINA	L-METIONINA	L-ORNITINA	L-SERINA	L-CISTEINA	D-ARABINOSA	MANITOL	SORBITOL	TREHALOSA	XILOSA	MANOSA	MALTOSA	RIBOSA	GALACTOSA	SACAROSA	ACIDO BENZOICO	ACIDO LACTICO	ACIDO CITRICO	ACIDO BUTIRICO	GLICEROL	ACIDO SUCCINICO	ACIDO MALONICO	ACIDO HIPURICO	ACIDO FUMARICO	ACIDO TARTARICO		
V	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0		
W	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0		
X	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	
Y	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	
X	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	
A 1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1			
B 1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0		
C 1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
D 1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
E 1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
F 1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
G 1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
H 1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
I 1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
J 1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
K 1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L 1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M 1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	

## 9.2. ANALISIS TAXONOMICO DE RESULTADOS

Se realizaron 50 pruebas, incluyendo, pruebas bioquímicas y nutricionales; para la realización de las pruebas se utilizó el medio BHI. Estas pruebas se seleccionaron para observar la variación en los resultados del análisis fenotípico. Haciendo uso de los coeficientes de asociación simple ( $S_{SM}$ ) de Sokal and Michener(1958), así como el coeficiente de Jaccard ( $S_J$ ) (Jaccard, 1908), se obtuvieron las matrices de semejanza y se construyeron los dendogramas correspondientes mediante la técnica UPGMA “Unweighted Pair Group Mean Average” de Sneath and Sokal (1973). El análisis numérico se realizó utilizando el programa NTSYS-pc versión 2.06 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analisis System) de (Rohlf, 1993).

En la figura 4, se muestra el dendrograma obtenido del análisis numérico en el cual se observa la formación de 4 grupos, los miembros que los constituyen están distribuidos de la siguiente forma:

**GRUPO I.** U-NICOC2, U-NICOC341, U-NICOC37, U-NICOC302, U-NICOC351, U-NICOC62.

**GRUPO II.** U-NICOC61, U-NICOC39, U-NICOC24, U-NICOC26B, U-NICOC310, U-NICOC305, U-NICOC309, U-NICOC304, U-NICOC308, U-NICOC33.

**GRUPO III.** U-NICOC7, U-NICOC8, U-NICOC10, U-NICOC23, U-NICOC10A, U-NICOC28, U-NICOC13A.

**GRUPO IV.** U-NICOC12, U-NICOC303, U-NICOC15, U-NICOC22, U-NICOC301.

Las características que comparten los miembros de cada grupo y que dieron lugar a la formación de los mismos se expresan en la tabla 5.

**TABLA 5. CARACTERÍSTICAS DE LOS GRUPOS FORMADOS A PARTIR DEL ANÁLISIS FENOTÍPICO.**

I		II		III		IV	
Pruebas positivas	Pruebas negativas						
Caseína	Tirosina	Caseína	Indol	Almidón	Caseína	Caseína	Tirosina
Almidón	Xantina	Xantina	Lisozima	Esculina	Tirosina	Almidón	Xantina
Citrato	Vogues	Hipoxantina	Ac. Láctico	Lisozima	Xantina	Gelatina	Hipoxantina
Esculina	proskauer	na	Ac. Cítrico	Ramnosa	Hipoxantina	Esculina	Indol
Ramnosa	Indol	Almidón	Ac. Butírico	Glucosa	Gelatina	Ramnosa	Lisozima
Glucosa	Ac. Benzoico	Citrato	Ac. Succínico	Glicerol	Indol	Glucosa	Arabinosa
Glicerol	Ac. Láctico	Esculina	Ac. Malónico	Fructosa		Glicerol	Manitol
Fructosa	Ac. Cítrico	Ramnosa	Ac. Fumarico	Inositol		Fructosa	Sorbitol
Inositol	Ac. Butírico	Glucosa	Ac. Tartárico	Manitol		Inositol	Trehalosa
Manitol	Ac. Succínico	Glicerol		Arginina			Xilosa
Arginina	Ac. Malónico	Fructosa		Ornitina			Manosa
Ornitina	Ac. Hipúrico	Inositol		Alanina			Maltosa
Alanina	Ac. Fumarico	Manitol		Asparagina			Ribosa
Arginina	Ac. Tartárico	Arginina		Fenilalanina			Galactosa
Asparagina		Ornitina		Glicina			Sacarosa
Fenilalanina		Alanina		Histidina			Ac. Benzoico
Glicina		Asparagina		Metionina			Ac. Láctico
Histidina		na		Serina			Ac. cítrico
Metionina		Fenilalanina		Cisteína			Ac. Butírico
Serina		Glicina		Arabinosa			Ac. Succínico
Cisteína		Histidina		Manitol			Ac. Malónico
Arabinosa		Metionina		Sorbitol			Ac. Hipúrico
Sorbitol		Serina		Trehalosa			Ac. Fumarico
Trehalosa		Cisteína		Xilosa			Ac. Tartárico
Xilosa		Arabinosa		Manosa			
Manosa		Manitol		Maltosa			
Maltosa		Sorbitol		Ribosa			
Ribosa		Trehalosa		Galactosa			
Galactosa		Xilosa		Sacarosa			
Sacarosa		Manosa		Ac. Láctico			
		Maltosa		Ac. Cítrico			
		Ribosa		Ac. Butírico			
		Galactosa		Glicerol			
		Sacarosa		Ac. Fumarico			
		Glicerol		Ac. Tartárico			

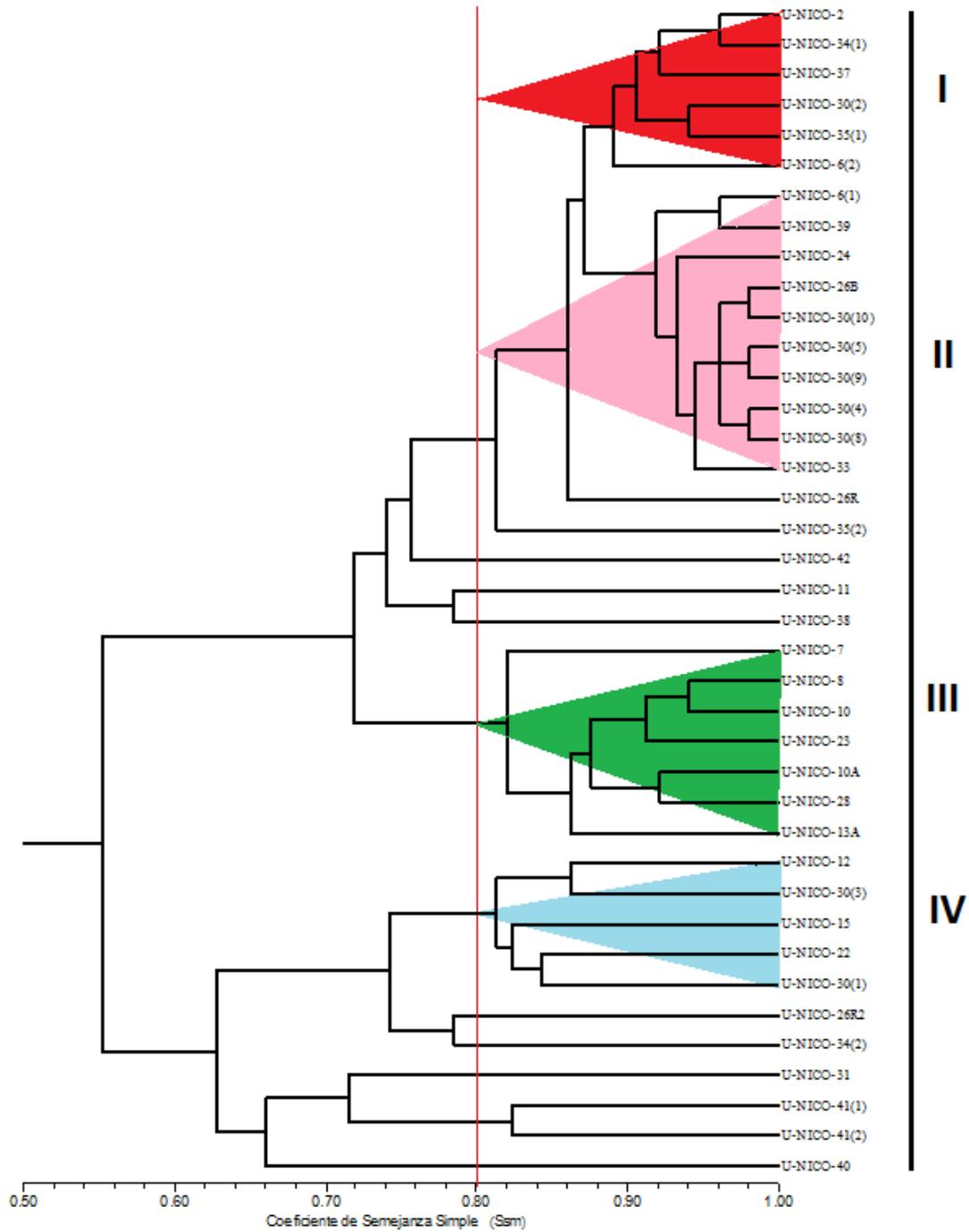


Figura 43. Dendrograma obtenido del análisis fenotípico

## 10. CONCLUSIONES

- En este estudio se aislaron 39 cepas de actinomicetos a partir de sedimento de agua dulce en Ichaqueo Michoacán.
- Se creó la primera colección caracterizada fenotípicamente de actinomicetos aislados de sedimento para el cepario-colección del laboratorio de microbiología QFB - UMSNH.
- Se confirmó por sus características macro y microscópicas que los microorganismos aislados corresponden morfológicamente a cepas de actinomicetos.
- El análisis fenotípico demostró que las cepas analizadas son probablemente ecoespecies distintas debido a que las características metabólicas son diferentes a cada especie.
- Se clasificaron 4 grupos distintos de actinomicetos de acuerdo al análisis de taxonomía numérica expresado en el dendrograma.
- El estudio permitió tener un panorama generalizado de la diversidad de actinomicetos que se encuentran en el sedimento de Ichaqueo Michoacán.

## 11. PERSPECTIVAS

- Realizar extracción de ADN de cada uno de los morfotipos obtenidos.
- Amplificar el gen ARNr 16S a partir de los aislamientos.
- Secuenciación del gen ARNr 16S y búsqueda de homología.
- Identificar nuevas especies de Actinomicetos a partir de la secuenciación.
- Conocer la presencia y distribución geográfica de las especies de actinomicetos en los principales cauces naturales de Michoacán.
- Publicación de nuevas especies.

## 12. ANEXOS

### 12.1. PRUEBAS BIOQUIMICAS Y MEDIOS DE CULTIVO

#### 12.1.1. Indol

##### Ingredientes

Triptona	10.0 g
Solución de sales al 1% c.s.p	1.0 L

pH=7.6

El medio se inoculó a partir de un cultivo líquido reciente, se incubó a 37°C durante 5-7 días; para la lectura se adicionaron 0.5 ml del reactivo de Kovacs para indol, se agitó y al cabo de un minuto se observó el color, considerando positiva la producción de un anillo rojo en la parte superior del medio.

Reactivo de Kovacs para indol:

p-fenilendiaminobenzaldehído	5.0 g
Alcohol amílico	75 ml
HCl concentrado	25 ml

El aldehído se disolvió en el alcohol por calentamiento suave en baño maría (50.55 °C), se dejó enfriar y se adicionó al ácido. Se recomienda proteger de la luz y almacenarlo a 4°C. El color del reactivo debe ser amarillo o marrón claro.

#### 12.1.2. Rojo de metilo

##### Ingredientes:

NaCl	98.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.0 g
KCl	2.0 g
Peptona bacteriológica	7.0 g
Extracto de levadura	2.5 g
Glucosa	5.0 g
Agua destilada c.s.p.	1.0 L

pH=7.6

Para su lectura se adicionaron unas gotas de solución de rojo de metilo, se agitó y se observó un posible cambio de color, el rojo indica que la prueba es positiva, el naranja dudosa y el amarillo negativa.

Solución de rojo de metilo:

Rojo de metilo	0.04 g
Etanol	40.0 ml
Agua destilada c.s.p	1.0 L

Se disolvió el rojo de metilo en alcohol y se completó hasta el volumen final con agua destilada.

**12.1.3. Prueba de Vogues- Proskauer**

El medio de cultivo y condiciones utilizadas son las mismas que en la prueba de rojo de metilo. Para la lectura se adicionaron 0.6 ml de solución de alfa-naftol al 0.5% en etanol y 0.2 ml de la solución acuosa de KOH al 40%. Los tubos se examinaron a los 15 minutos y después de una hora.

La reacción positiva estuvo indicada por la presencia de un color rojo intenso.

**12.1.4. Descarboxilación de arginina y lisina**

Medio utilizado:

Peptona bacteriologica	1.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3 g
Rojo de fenol	0.01
Agar	3.0 g
Arginina o Lisina	10.0 g
Agua destilada	1.0 L

El pH se ajustó hasta conseguir un color amarillo anaranjado en el medio.

Los respectivos aminoácidos se esterilizan por filtración y se adicionan en cada caso al medio estéril a 55-60 °C. La siembra se realiza por picadura. La incubación se realiza a 37°C durante 24 horas y transcurrido este tiempo la presencia de un color rojo de los tubos indica una reacción positiva debida a la liberación de aminas por descarboxilación.

#### 12.1.5. Hidrólisis de gelatina

Se utilizó el medio BHI adicionando gelatina al 1%, se colocó en tubos y se sembró. Se incubaron a 37°C durante 7 días y la lectura se realizó colocando los tubos en hielo o refrigeración por media hora considerándose positiva aquella cepa que fuera capaz de mantener el medio líquido indicando la hidrólisis de la gelatina.

#### 12.1.6. Hidrólisis de Caseína

Se utilizó el medio agar de caseína modificado, el cual está constituido por partes iguales de leche descremada y agar doble concentración; ambos componentes se esterilizaron por separado y previo enfriamiento a 55-60°C se mezclaron distribuyéndose en placas Petri.

La inoculación se realizó mediante una extensión de 4 microorganismos por placa y después de la incubación a 37°C durante 7 días se procedió a realizar la lectura añadiendo el reactivo de Frazier, la interpretación se consideró positiva al aparecer una zona de aclaramiento alrededor del crecimiento bacteriano, que indicó la hidrólisis de la caseína.

#### 12.1.7. Medio para Determinación de Descomposición de Esculina

##### Ingredientes:

Esculina	1.0 g
Citrato férrico	0.5 g
Peptona	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agua destilada	1.0 L

Se prepara caldo control, el cual no tiene esculina, se inocula con algunas gotas de crecimiento en caldo. Se observa por 4 semanas. La lectura se consideró positiva cuando apareció un color marrón oscuro o negro alrededor de la zona de crecimiento, debido a que en la hidrólisis de la esculina se forma esculetina, que con el Fe<sup>3+</sup> presente en el medio, da un complejo fenólico de color negro.

### 12.1.8. Medio para la Determinación de Resistencia a la Lisozima

Caldo glicerol

Peptona	5.0 g
Glicerol	70.0 g
Agua destilada	1 L

Preparación de la Lisozima

Lisozima	100 mg
Solución de Ácido Clorhídrico	100 ml

Se disuelve y se esteriliza por filtración.

Mezcla: 95 ml caldo glicerol estéril, 5 ml lisozima esterilizada por filtración. Se distribuye a tubos en forma estéril. Se deben preparar tubos con medio control: caldo glicerol sin lisozima.

Inóculo: una gota de cultivo en caldo. Se inocula y observa hasta después de 4 semanas.

Prueba positiva: si hay crecimiento en los dos tubos (tubo con lisozima y sin lisozima).

Prueba negativa: si no hay crecimiento o es muy pobre en el medio con lisozima y grueso en el tubo control.

### 12.1.9. Medio para determinación de Acidificación de Carbohidratos

Medio base:

Fosfato de amonio di básico	1.0g
Ácido clorhídrico	0.02 g
Sulfato de magnesio.7H <sub>2</sub> O	0.2 g
Agua destilada	1 L

Se agrega al medio 15 ml de una solución de rojo de metilo al 0.08% para cada litro de medio base. El pH debe ser de 7.0 se esteriliza. Se agrega 0.5 ml de cada carbohidrato, (solución al 10%) esterilizando por filtración, cada tubo con 5 ml de medio base. Los medios se inoculan con varias gotas de crecimiento en caldo. Se incuba por 4 semanas.

Reacción positiva: color amarillo. Acidificación del medio.

Se usaron los siguientes carbohidratos: fructosa, inositol, glucosa, glicerol, manitol y ramnosa.

**12.1.10. Utilización de carbohidratos y ácidos orgánicos como única fuente de carbono y energía.**

Medio base:

KCl	2.0 g
KNO <sub>3</sub>	1.0 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g
Extracto de levadura	0.01 g
Agar	20.0 g
Agua destilada	1 L

pH= 7.6

Para realizar esta prueba se utilizó el medio BHI al cual se le adicionaron los sustratos a probar, que se esterilizaron por filtración. La prueba se realizó en cajas de Petri, las cuales se inocularon con un cultivo joven, se incubaron a 37 °C y se realizaron lecturas periódicas hasta los 7 días considerando como positivo el crecimiento en la placa y negativo la ausencia de este.

En el caso de los carbohidratos se empleó una concentración final de 0.2% y para los ácidos orgánicos 1% los sustratos utilizados fueron: D- arabinosa, D-galactosa, maltosa, D- manitol, D- manosa, D- ribosa, D-sacarosa, D-sorbitol, D-trealosa, D-xilosa, Ac. Benzoico, Ac. Láctico, Ac. Cítrico, Ac. Butírico, Ac. Malónico, Ac. Sussínico, Ac. Hipúrico, Ac. Fumarico, Ac. Tartárico.

**12.1.11. Utilización de aminoácidos y derivados como única fuente de carbono, nitrógeno y energía.**

Se emplea la misma técnica y metodología que en el apartado anterior.

Medio base:

KCl	2.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g
Extracto de levadura	0.01 g
Agar	20.0 g
Agua destilada c.s.p.	1 L

pH=7.6

El sustrato se esteriliza por separado por filtración y se adiciona al medio a una concentración final de 0.1%. Los compuestos empleados como fuente de carbono nitrógeno y energía fueron: L-alanina, L-arginina, L-asparagina, L-fenilalanina, Glicina, L-histidina, L-metionina, L-ornitina, L-serina y L-cisteína.

#### **12.1.12. Agar Extracto de Malta modificado**

##### Ingredientes:

Malta	10.0 g
Glucosa	1.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Agar	15.0 g
Extracto de carne	2.0 g
Peptona de caseína	4.0 g
Triptona	1.0 g
Agua destilada	1 L

Se colocó en tubos y placas y se sembró. Se incubaron a 37°C durante 7 días.

#### **12.2. TINCIONES**

##### **12.2.3. TINCION GRAM**

##### Reactivos:

- Solución de violeta de Genciana o cristal violeta (2 g de violeta de Genciana más 20 ml de etanol al 95%)
- Solución yodo-lugol (1 g de yodo, 2 g de yoduro de potasio en 300 ml de agua destilada)
- Solución alcohol-cetona (alcohol al 95% 100 ml y 50 ml de cetona)
- Solución de safranina (2.5 g de safranina más 100 ml de etanol al 95%)

##### Procedimiento:

Realizar fortis con el microorganismo que se desea teñir fijándolo con aire u pasándolo por el mechero un par de veces. Una vez fijo se agrega el cristal violeta por 1 minuto y se lava (con agua), se agrega Iodo-lugol durante 1 minuto y después de lava, se decolora con alcohol-cetona hasta que se libere el colorante y se vuelve a lavar.

Finalmente se agrega safranina durante 1 minuto y se lava, se seca y se observa al microscopio.

#### **12.2.4. TINCION ZIEHL-NEELSEN**

Reactivos:

- Fucsina-fenicada
- Alcohol-ácido
- Azul de metileno

Procedimiento:

Hacer un frotis de la muestra, una vez fijado aplicar fucsina-fenicada por 5 minutos calentando con un mechero hasta la emisión de vapores (3-5 minutos) y lavar (con agua), después se decolora con alcohol-ácido hasta eliminar colorante y se lava. Posteriormente aplicar azul de metileno por 1 minuto y se lava, se seca y se observa al microscopio.

### 13. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Albarracín, V.H., M.J. Amoroso & C.M. Abate. 2005. Isolation and characterization of indigenous Koper-resistant actinomycete strains. *Chem. Erde*. 65: 145-156.
- Ben-Omar N., M.L. Merroun, J.M. Arias Peñalver & M.T. González Muñoz. 1997. Comparative heavy metal bio sorption study of Brewery yeast and *Myxococcus Xanthus* biomass.
- Berdy J. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* 2004; 58; 1-26
- Boudemagh, A., M. Kitouni, F. Boughachiche, H. Hamdiken, L. Oulmi, S. Reghioua, H. Zerizar, A. Couble, D. Mouniee, A. Boulahroug & P. Boiron. 2005. Isolation and molecular identification of actinomycete microflora, of some Saharian soils of South East Algeria (Biskra, EL-Ouded and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains. *J. Mycolog. Med.* 15: 39-44.
- Ezziyyani M., C. Pérez, M. Requena, et al. 2004. Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. *Biología* 26:61-68
- Franco-Correa, M. 2008. Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis Doctoral, Director: Dr. José Miguel Barea N. Departamento de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. pp. 266
- Ghanem N.B., S.A. Sabry, Z.M. El-shef, et al. 2000. Isolation and Enumeration of marine Actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. *Applied and Environmental Microbiology*. 46:105-111
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and Williams, S. T. "The Actinomycetes. Groups 22-29". En: *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994, p. 605-703.

- Hua-Li, X., L. Qi-Ren & J. Cheng-Lin. 1996. Diversity of soil Actinomycetes in Yunnan China. *Appl. Environ. Microbiol.* 6: 244-248.
- Kennedy, A. & K. Smith. 1995. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant Soil* 170: 75-86.
- Koneman, E., Allen, S., & Schreckenberger, P. (2001). *Diagnóstico Microbiológico* (Quinta edición ed.). Washington: Médica Panamericana.
- McNeil MJ, Brown J. The medically important aerobic actinomycetes: Epidemiology and Microbiology. *Clin. Microbiol. Reviews.* 1994; 7(3): 357-417
- Olalde, P. y Aguilera, G. Microorganismos y biodiversidad. *Terra* 16: (3) 289-292. 1998.
- Oskay M, Tamer AU, Azeri C. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African J. Biotechnol.* 2004;3(9):441-6.
- Prashith Kekuda, Shobha KS, Onkarappa R. fascinating diversity and potent biological activities of Actinomycete metabolites. *J Pharmacy Res.* 2010;3(2):250-6.
- Schaal CP, Yasin AF, Stackebrandt E. The family Actinomycetaceae. The Genera *Actinomyces, Arcanobacterium, Varibaculum, and Mobiluncus*. *Prokaryotes.* 2006. 3. 430-537.
- Serrano JA, Sandoval AH. El micetoma. Revision. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2003, 23(1); 70-79

- Serrano, José A ,Sandoval Trujillo, A.H. “Manual de Laboratorio para el Estudio de los Actinomicetales Patógenos”. 1ª ed. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela, 1992; p. 18-19.
- Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins,1986, vol.2.
- Valdés M., N. Pérez, P. Estrada, et al. 2005. Non-Frankia Actinomycetes Isolated from Surface-Sterilized Roots of *Casuarina equisetifolia* Fix Nitrogen. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 1:460
- Waksman, S. 1967. *The Actinomycetes, a summary of current knowledge*. The Ronald Press Company, Nueva York. Nueva York, EEUU.
- Williams, S. T., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams &Wilkins, 1989, vol. 4.
- Williams, S.T., S. Lanning & E. Wellington. 1984. Ecology of Actinomycetes, p. 45-53, *In* M. Goodfellow., M. Mordarski & S.T. Williams. *The biology of the Actinomycetes*. Academic Press. Londres, Inglaterra.
- Wilson, M. A., Rimler, R. B., y Hoffman, L. J. (1992). Comparison of DNA fingerprints and somatic serotypes of serogroup B and E *Pasteurella multocida* isolates. *J.Clin.Microbiol.* 30, 1518-1524.
- Xu, L-H., Q-R. Li & C-L. Jiang. 1996. Diversity of aquatic Actinomycetes in lakes of the Middle Plateau, Yunnan, China. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 249-253.

