



**UNIVERSIDAD MICHOACANA  
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA**

**LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA**

**“BIODIVERSIDAD FILOGENÉTICA  
DE ACTINOMICETOS AISLADOS DE  
ICHAQUEO, MICHOACÁN”**

**TESIS**

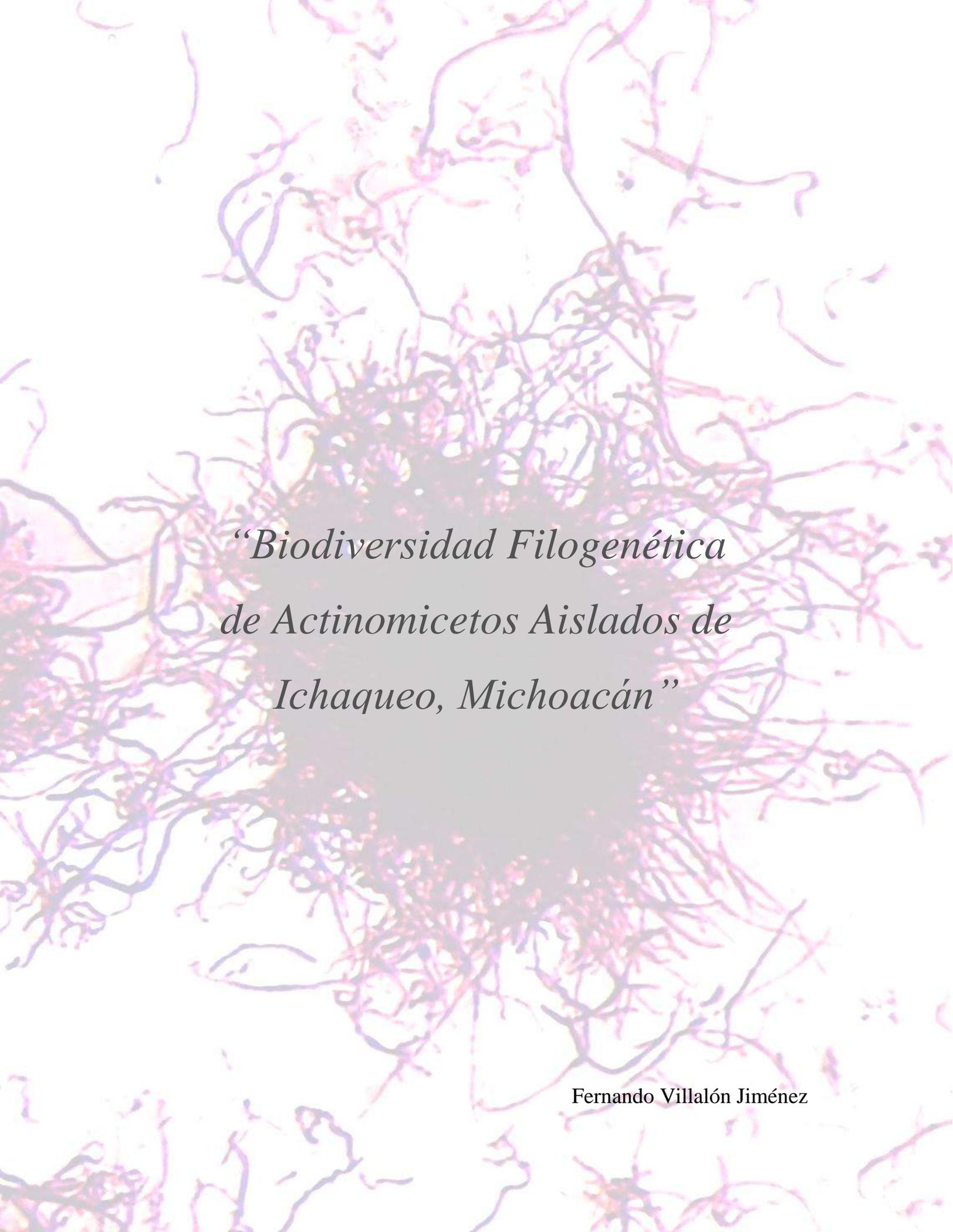
Para obtener el grado de:  
**QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA:  
FERNANDO VILLALÓN JIMÉNEZ**

**ASESORES:**  
**Maestra en Salud Publica Karla Gabriela Domínguez González**  
**Doctor en Ciencias Biologicas Ángel Horacio Sandoval Trujillo**

**Morelia, Michoacán; Febrero 2014**



A microscopic image showing a dense network of thin, purple-stained filaments, likely actinomycetes, against a light background. The filaments are intertwined and form a complex, web-like structure.

*“Biodiversidad Filogenética  
de Actinomicetos Aislados de  
Ichaqueo, Michoacán”*

Fernando Villalón Jiménez



**UNIVERSIDAD MICHOACANA  
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA**

**LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA**

**“BIODIVERSIDAD FILOGENÉTICA  
DE ACTINOMICETOS AISLADOS DE  
ICHAQUEO, MICHOACÁN”**

**TESIS**

Para obtener el grado de:  
**QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA:  
FERNANDO VILLALÓN JIMÉNEZ**

**ASESORES:  
M.S.P. KARLA GABRIELA DOMÍNGUEZ GONZÁLEZ  
Dr. ÁNGEL HORACIO SANDOVAL TRUJILLO**

**Morelia, Michoacán; 2014**



### **Asesores:**

**Asesor interno:** M.S.P. Karla Gabriela Domínguez González (QFB-UMSNH)

**Asesor externo:** Dr. Ángel Horacio Sandoval Trujillo (UAM-X)

### **Sinodales:**

**Presidente:** M.A.H. Sandra María Suarez Moreno (QFB-UMSNH)

**Primer vocal:** Dra. Ninfa Ramírez Durán (FM-UAEMex)

**Segundo vocal:** Dr. Jorge Francisco Cerna Cortes (ENCB-IPN)

**Primer suplente:** Q.F.B. Ricardo Jiovanni Soria Herrera (QFB-UMSNH)

**Segundo suplente:** Q.F.B. Ricardo Vega Tavera (QFB-UMSNH)



La presente tesis se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, el Laboratorio Producción de Biológicos “George Michel”, de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco y el Laboratorio de Investigación en Microbiología Médica y Ambiental de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México.

*“Tesis apoyada por el Consejo Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación del Estado de Michoacán”*



***“A person, who never made a mistake,  
never tried anything new.”***

Albert Einstein

***“Actinomycetes are very important from a medical point of view...  
They may be a nuisance, as when they decompose rubber products,  
grow in aviation fuel, produce odorous substances that pollute  
water supplies, or grow in sewage-treatment plants where they  
form thick clogging foams... In contrast, Actinomycetes are the  
producers of most of the antibiotics.”***

H.A. Lechevalier and M.P. Lechevalier

***“You can never cross the ocean unless you  
have the courage to lose sight of the shore.”***

Christopher Columbus

## Agradecimientos

Ha llegado el momento de escribir la última página de este trabajo, en el cual agradezco a todas las personas que me apoyaron y alentaron para seguir adelante cada día, así como me ayudaron a crecer y madurar tanto académica como personalmente.

A mis padres; Fernando Villalón y Julissa Jiménez, así como a mis abuelos; Antonio Jiménez y Magdalena Delgado, por confiar y apoyarme durante mis estudios que hoy después de tiempo y esfuerzo, el resultado se ve reflejado en el presente trabajo, con el cual termino un ciclo de mi vida, pero a la vez inicio uno nuevo.

A mi asesora y amiga, MSP Karla G. Domínguez, quiero agradecer de forma especial por confiar en mí, por sus regaños y consejos, así como por los buenos momentos que compartimos dentro y fuera del laboratorio, pero sobre todo por tu amistad.

Al QFB Ricardo J. Soria, a la QFB Yazmín Cuevas, y a la QFB J. Karina Hernández, por su amistad, confianza, consejos, por los buenos y los malos momentos que fueron fundamentales durante el desarrollo y escritura de ésta tesis.

A todas las personas que formaron parte del equipo de trabajo del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Químico Farmacobiología y con las cuales llegamos a ser buenos amigos; Salvador Chairez, J. Agustín Manríquez, Efraín Vega, Gloria R. Onchi, Jaime J. Martínez, A. Gabriela Rodríguez, M. Isabel Hajar, Yuliana Negrete, Lucero Calderón.

Al QFB Ricardo Vega, por permitirme realizar este trabajo en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Químico Farmacobiología.

Al Dr. Á. Horacio Sandoval, ya que sin conocerme me aceptó y confió en mí para trabajar en su laboratorio, durante una estancia de verano, con la cual se logró realizar una vinculación para concluir la presente tesis, así como por sus consejos y conocimientos transmitidos.

A la QFB Nora L. Sánchez, por tomarse el tiempo de revisor de este trabajo, así como por compartir sus conocimientos y experiencia.

A los nuevos amigos que conocí en el Laboratorio Producción de Biológicos de la Universidad Autónoma de Metropolitana-Xochimilco; Janette Nava, Copitzin González, Tania Martínez, Lesly Monroy, Karla Ríos, Marcos Sánchez, e Isaac Quiroga.

A la Dra. Ninfa Ramírez, por abrirme las puertas de su laboratorio y aceptarme en su equipo de trabajo, para desarrollar la parte experimental de la identificación de actinomicetos, así como por compartir sus conocimientos.

A la MCS Gabriela S. Alonso, al QFB Luis Á. Zapí, y al Dr. Adrián Zaragoza, por su amistad, y hacer de mi estancia en el Laboratorio de Investigación Médica y Ambiental de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México, un periodo muy agradable.

Al Programa Interinstitucional para el Fortalecimiento de la Investigación y el Posgrado del Pacífico (Programa Delfín), por permitirme realizar una estancia durante el XVII Verano de la Investigación Científica y Tecnológica del Pacífico, con la cual fue posible realizar una vinculación para desarrollar este proyecto de tesis, sin olvidar al Consejo Estatal de Ciencia Tecnología e Innovación de Michoacán (CECTI), por hacerme acreedor a la beca; tesis para la transferencia de conocimientos y tecnología.

## Índice

Resumen .....	1
Abstract .....	2
1. Ichaqueo .....	3
2. Ecología microbiana .....	4
2.1. Ecosistemas acuáticos .....	4
2.2. Diversidad microbiana .....	5
3. Actinomicetos .....	7
3.1. Características generales .....	8
3.2. Hábitat .....	12
3.3. Condiciones de crecimiento .....	12
3.4. Antecedentes de actinomicetos aislados de ambientes acuáticos .....	13
4. Taxonomía .....	16
4.1. Especie bacteriana .....	17
5. Filogenia .....	18
5.1. Análisis filogenético .....	18
5.2. Cronómetros moleculares .....	19
5.3. Genes utilizados en el análisis filogenético .....	20
5.4. Secuenciación .....	21
5.5. Árboles filogenéticos .....	24
6. Justificación .....	26
7. Hipótesis .....	27
8. Objetivos .....	27
8.1. Objetivo general .....	27
8.2. Objetivos particulares .....	27
9. Diseño de la investigación .....	28
10. Muestras .....	28
11. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación .....	28
12. Materiales y Métodos .....	29
12.1. Materiales utilizados .....	29
12.2. Reactivos utilizados .....	29
12.3. Equipos utilizados .....	31

12.4. Método para aislar actinomicetos de la cascada de “Chorro Prieto” .....	32
12.5. Obtención de biomasa.....	32
12.6. Extracción de DNA.....	33
12.7. Amplificación del inserto del gen 23S rRNA .....	34
12.8. Amplificación del gen 16S rRNA.....	35
12.9. Electroforesis .....	35
12.10. Purificación de productos de PCR para secuenciación.....	36
12.11. Identificación .....	36
12.12. Construcción del árbol filogenético .....	37
12.13. Crioconservación .....	37
12.14. Conservación en suelo estéril modificado .....	38
13. Resultados y Discusión .....	39
13.1. Características de las muestras de sedimento de Ichaqueo, Michoacán. ....	39
13.2. Morfología macroscópica y microscópica de las cepas aisladas de Ichaqueo, Michoacán.....	40
13.3. Amplificación del marcador filogenético de bacterias de alto G+C.....	50
13.4. Amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA .....	52
13.5. Identificación de los Actinomicetos .....	54
13.6. Análisis filogenético de los actinomicetos identificados .....	59
14. Conclusiones.....	64
15. Referencias .....	66
16. Productividad.....	71
16.1. Estancia de verano durante el; XVII Verano de la Investigación Científica y Tecnológica del Pacífico (Programa Delfín), en el Laboratorio Producción de Biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. ....	71
16.2. Congreso Nacional del XVII Verano de la Investigación Científica y Tecnológica del Pacífico. ....	71
16.3. V Simposio Internacional en Biología de Nocardia y VI Simposio Internacional de Micetoma .....	71
16.4. 38° Congreso de la Asociación Mexicana de Microbiología, A.C.....	72
17. Anexos.....	73
17.1. Medio Extracto de Malta .....	73
17.2. Caldo Extracto de Malta .....	73
17.3. Tinción de Gram .....	73

## Índice de Imágenes

<b>Imagen 1.</b> Ubicación de la cascada "Chorro Prieto" en Ichaqueo, Michoacán. ....	3
<b>Imagen 2.</b> Dominios; <i>Bacteria</i> , <i>Archaea</i> y <i>Eukarya</i> .....	6
<b>Imagen 3.</b> Diversidad y abundancia de especies microbianas.....	6
<b>Imagen 4.</b> Phylum actinobacteria. ....	7
<b>Imagen 5.</b> Países que han aislado actinomicetos de diversos sedimentos. ....	15
<b>Imagen 6.</b> Reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) .....	22
<b>Imagen 7.</b> Alineamiento de secuencias.....	23
<b>Imagen 8.</b> Árboles filogenéticos .....	24
<b>Imagen 9.</b> Electroforesis de la amplificación del marcador filogenético presente en el gen 23S rRNA. ....	50
<b>Imagen 10.</b> Electroforesis de la amplificación del gen 16S rRNA.....	53
<b>Imagen 11.</b> Géneros de actinomicetos identificados en Ichaqueo.....	54
<b>Imagen 12.</b> Árbol filogenético de la cepa identificada en el género <i>Streptosporangium</i> ....	59
<b>Imagen 13.</b> Árbol filogenético de las cepas identificadas en el género <i>Micromonospora</i> . .	60
<b>Imagen 14.</b> Árbol filogenético de las cepas identificadas en el género <i>Rhodococcus</i> . ....	61
<b>Imagen 15.</b> Árbol filogenético de las identificadas en el género <i>Streptomyces</i> . ....	62

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Recursos y condiciones para el crecimiento en la naturaleza.....	5
<b>Tabla 2.</b> Tipos de pared celular de los actinomicetos.....	9
<b>Tabla 3.</b> Familias, Géneros y Características de los Actinomicetos.....	10
<b>Tabla 4.</b> Jerarquías taxonómicas.....	16
<b>Tabla 5.</b> Secuencias de los cebadores estándar 27f y 1492r.....	22
<b>Tabla 6.</b> Características de las muestras tomadas en la cascada "Chorro Prieto", Ichaqueo, Michoacán. ....	39
<b>Tabla 7.</b> Resultados de la morfología macroscópica y microscópica de las cepas aisladas del sedimento de la cascada "Chorro Prieto" en Ichaqueo, Michoacán. ....	40
<b>Tabla 8.</b> Pruebas bioquímicas realizadas a las cepas aisladas de Ichaqueo.....	49
<b>Tabla 9.</b> Resultados de la amplificación del inserto del gen 23S rRNA. ....	51
<b>Tabla 10.</b> Identificación de los actinomicetos aislados de Ichaqueo.....	55
<b>Tabla 11.</b> Cepas identificadas con tres especies del género <i>Streptomyces</i> . ....	57

## Resumen

En la localidad de Ichaqueo, se encuentra ubicada la cascada “Chorro Prieto” en medio de una zona boscosa a 17 Km al sur de Morelia, Michoacán a 2440 msnm, siendo este un hábitat propicio para el desarrollo de actinomicetos.

Los actinomicetos son bacterias aerobias Gram positivas, filamentosas, ramificadas, las cuales al fragmentarse forman elementos cocoidales o bacilares, estando ampliamente distribuidos en suelo, así como en otros ambientes naturales. En la actualidad, los actinomicetos se encuentran incluidos en el dominio bacteria debido a varias razones: su pared celular está compuesta por peptidoglicano, el diámetro de sus filamentos es inferior al de los hongos, son sensibles a los antimicrobianos pero son resistentes a los antifúngicos y su material genético es procariota, además se caracterizan por presentar un alto contenido de Guanina y Citosina en su DNA, encontrándose entre 51 a 78%.

La identificación de los actinomicetos aislados de Ichaqueo, Michoacán, se realizó de acuerdo a las características macroscópicas y microscópicas propias de los actinomicetales, posteriormente se utilizaron técnicas de biología molecular como la amplificación de un marcador filogenético de bacterias Gram positivas de alto contenido de Guanina-Citosina (presente en el gen 23S rRNA), para comprobar que pertenecen al orden de los actinomicetales, así como la amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA para realizar la identificación genética y la realización de un análisis filogenético.

Con la amplificación del marcador filogenético presente en el gen 23S rRNA se comprobó que 35 de las 39 cepas aisladas corresponden al orden de los actinomicetales y con la amplificación del gen 16S rRNA se identificaron los siguientes géneros *Rhodococcus*, *Micromonospora*, *Streptomyces* y *Streptosporangium*.

Siendo este trabajo el primero en su género en el estado de Michoacán, y con lo cual se pretende seguir adelante en la investigación de este tipo de microorganismos para determinar el potencial que estos pueden presentar y determinar su actividad biológica útil en caso de poseerla.

**Palabras clave;** Actinomicetos, 16S rRNA, 23S rRNA, *Rhodococcus*, *Micromonospora*, *Streptomyces*, *Streptosporangium*.

## Abstract

In Ichaqueo's town, in the middle of a wooded area, 17 Km south of Morelia, Michoacan, at 2440 meters above sea level a waterfall named "Chorro Prieto" is located which is a suitable habitat for the development of actinomycetes.

Actinomycetes are aerobic bacterias, Gram positive, filamentous, with branchings, and when they fragment they form coccoid or bacillar elements, and are widely distributed in the soil and other natural environments. Currently, actinomycetes are included on the bacteria domain due to several reasons: the cell wall is composed by peptidoglycan, the diameter of hyphae are lesser than fungi, they are sensitive to antimicrobial but are resistant to antifungal agents, and their genetic material is prokariotic. Furthermore they are characterized by a high Guanine-Cytosine content in their DNA, being between 51 to 78%.

Identification of isolated actinomycetes from the waterfall named "Chorro Prieto", Ichaqueo, Michoacan; was made according to the macroscopic and microscopic characteristics typical of the Actinomycetales. Subsequently, biomolecular techniques were applied such as the amplification of a phylogenetic marker from Gram positive bacteria with a high content of Guanine-Cytosine (also found in 23S rRNA gene), to prove that they belong to actinomycetales. Also the sequencing and amplification of 16S rRNA gene to complete the genetic identification and to make a phylogenetic analysis.

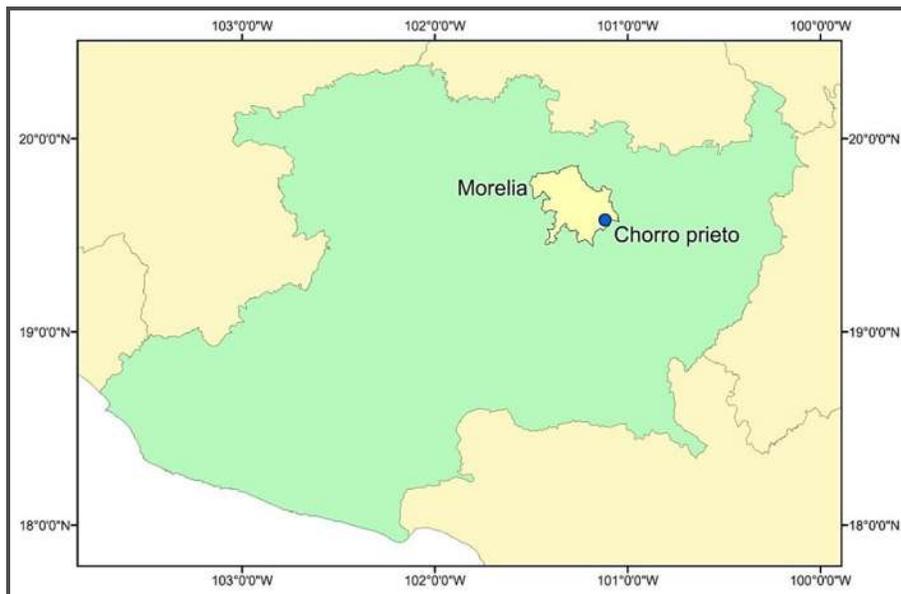
Using the amplification of the phylogenetic marker (23S rRNA), it was proved that 34 out of 39 isolated strains belong to the order of Actinomycetales and by amplification of 16S rRNA gene the following genera were identified: *Streptosporangium*, *Micromonospora*, *Rhodococcus* and *Streptomyces*.

This is the first work of its kind in the State of Michoacan, which is intended to move forward in the investigation of such microorganisms to determine the potential that these may have and determine if their biological activity is useful if they have one.

**Key words:** Actinomycetes, 16 rRNA, insert 23S rRNA, *Rhodococcus*, *Micromonospora*, *Streptomyces*, *Streptosporangium*.

## 1. Ichaqueo

La comunidad de Ichaqueo se ubica a 17 Km al sur de Morelia, capital del estado de Michoacán, México a una latitud de 19°34'43.20"N y longitud 101°7'3.14"O (Imagen 1), teniendo una altura de 2440 msnm; posee un clima de templado a frío con abundantes lluvias en verano (Salazar, 2013).



**Imagen 1.** Ubicación de la cascada "Chorro Prieto" en Ichaqueo, Michoacán.

La zona boscosa de esta localidad comprende una inmensa superficie, llena de ríos y cascadas entre las cuales se encuentra la cascada “Chorro Prieto”, la cual tiene 200 metros de altura, y cae por el desfiladero llamado “Ceja el Chillar” (Salazar, 2013).

En México se tienen escasos reportes de actinomicetos aislados de ambientes marinos o dulceacuícolas, y en Michoacán no se cuenta con ningún estudio de la biodiversidad de este tipo de microorganismos presentes en los diversos cauces naturales, por lo cual nace el interés por realizar un estudio microbiológico para poder identificar parte de la microbiota presente en este cuerpo de agua dulce (cascada “Chorro Prieto”, Ichaqueo, Michoacán), el cual está libre de actividad antropogénica y a la vez se encuentra dentro del municipio de Morelia lo cual facilitó el muestreo de dicho punto.

## **2. Ecología microbiana**

La ecología microbiana estudia la diversidad y funcionalidad de las comunidades microbianas, a través de sus actividades metabólicas, en los ambientes naturales donde estas habitan (Medina & Evangelista, 2011). Ya que los microorganismos al no vivir solos en la naturaleza e interactuar con los demás organismos que están presentes en su nicho, influyen en el ciclo de nutrientes, contribuyendo al funcionamiento del ecosistema. Considerando a un ecosistema como las comunidades de organismos en su ambiente, que lo auto-regulan (Prescott y col., 2002). Sin embargo un ecosistema está formado por hábitats diferentes, que son pequeñas porciones del ecosistema mejor adaptadas a uno o a un pequeño número de poblaciones microbianas (Madigan y col., 2009).

Los microorganismos en el ecosistema tienen dos funciones: 1) Sintetizar materia orgánica a partir de CO<sub>2</sub> y otros compuestos inorgánicos y 2) Descomponer la materia orgánica acumulada.

La tasa de actividad microbiana está controlada por los nutrientes y condiciones de crecimiento que prevalecen. En condiciones óptimas, la actividad microbiana puede afectar el ecosistema, lo cual aumenta o disminuye la actividad de los demás organismos presentes (Madigan y col., 2009).

### **2.1. Ecosistemas acuáticos**

Los principales ecosistemas microbianos de agua dulce son; las charcas, los lagos, los ríos y las corrientes. Estos ecosistemas pueden variar en la estructura física, la temperatura, la composición de nutrientes, el oxígeno y los productos de desecho, donde todos estos factores influyen en la diversidad y abundancia de los microorganismos presentes (Madigan y col., 2009).

Los ambientes de agua dulce son muy variables en recursos y condiciones para el desarrollo microbiano (Tabla 1). En los ambientes acuáticos están presentes organismos productores de oxígeno así como los consumidores, y el equilibrio entre la fotosíntesis y la respiración controla el oxígeno y los ciclos de carbono (Madigan y col., 2009).

**Tabla 1.** Recursos y condiciones para el crecimiento en la naturaleza.

Recursos	Condiciones
Carbono (orgánico CO <sub>2</sub> )	Temperatura: frío-templado-caliente
Nitrógeno (orgánico, inorgánico)	Potencial del agua: seco-húmedo-mojado
Otros macronutrientes; (S, P, K, Mg)	pH: 0-7-14
Micronutrientes (Fe, Mn, Co, Cu, Zn, Ni)	O <sub>2</sub> : oxido-microoxido-anoxido
Oxígeno y aceptores de electrones; (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , Fe <sub>3</sub> <sup>+</sup> , etc.)	Luz: brillante-atenuada-oscuridad
Donadores de electrones inorgánicos; (H <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> S, Fe <sup>2+</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> etc.)	Condiciones osmóticas: agua dulce-marina-hipersalinidad

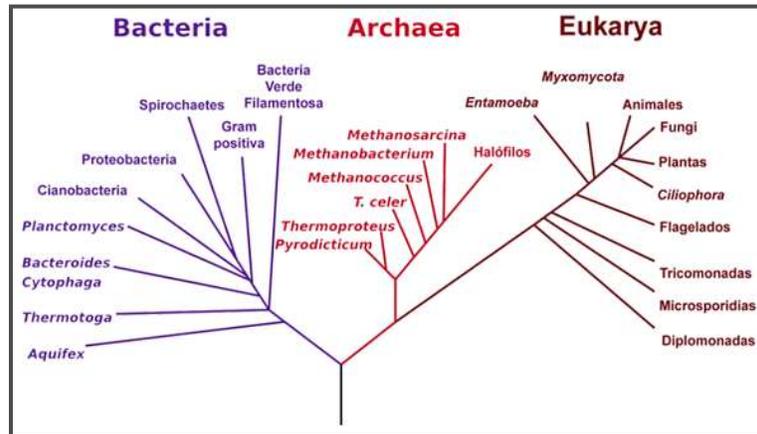
(Madigan y col., 2009)

## 2.2. Diversidad microbiana

El término biodiversidad nos da la imagen de ecosistemas en los que abundan especies tanto vegetales como animales. Sin embargo, son los microorganismos los que presentan una mayor diversidad biológica y funcional (Soler, 2012).

Tradicionalmente, los microorganismos han sido catalogados en procariontes y eucariontes basándose en la presencia o ausencia de membrana nuclear. Carl Woese en 1970, introdujo el término dominio para sustituir al reino como categoría taxonómica superior, y de esta forma distribuyó a los organismos en tres dominios; *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya* (Imagen 2) (Rodicio & Mendoza, 2004).

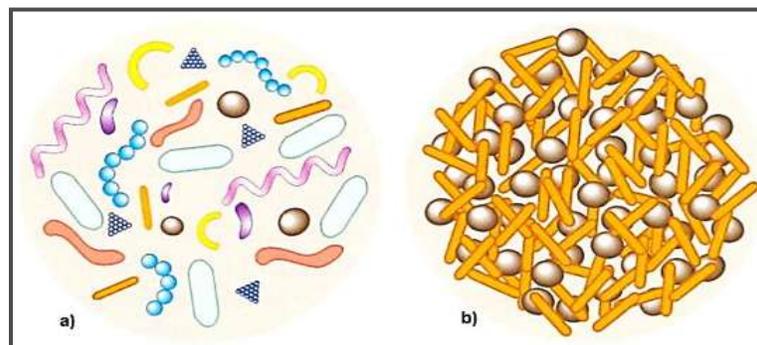
Dentro de estos dominios podemos incluir a la totalidad de especies conocidas hasta el momento, por los aportes de biólogos, genetistas, ecólogos, fisiólogos que hacen de la taxonomía una disciplina dinámica, flexible y cambiante (Soler, 2012).



**Imagen 2.** Dominios; *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya* (Rodríguez, 2012).

La cantidad de especies de organismos diferentes, los hábitats que ocupan y su diversidad genética constituyen los pilares de la biodiversidad. En consecuencia, la diversidad de especies revela de modo implícito una diversidad genética heterogénea de los organismos; al igual que la diversidad ecológica es una consecuencia de la diversidad de especies (Soler, 2012). Donde las especies microbianas que habitan un ecosistema son las mejor adaptadas para desarrollarse con los nutrientes y condiciones que ahí prevalecen, se pueden expresar de la siguiente forma: (Imagen 3) (Madigan y col., 2009).

- Diversidad; es el número total de especies diferentes que coexisten en el ecosistema.
- Abundancia; es la proporción de cada especie de microorganismos en el ecosistema.



**Imagen 3.** Diversidad y abundancia de especies microbianas (Madigan y col., 2009).

- Comunidad con gran diversidad de especies y abundancia moderada.
- Comunidad con baja diversidad pero elevada abundancia de especies.

### 3. Actinomicetos

Los primeros reportes de actinomicetos fueron los realizados por Ferdinand Cohn en 1875, sobre *Streptothrix foersteri* (Ul-Hassan & Wellington, 2009), y por Karl Otto Harz en 1877, quién encontró un grano actinomicético en la mandíbula de un buey y lo llamó *Actinomyces bovis* (Arenas, 2011). El término “Actinomicetos” deriva del latín “aktino” que significa rayo o en posición radiada y “mycete” que quiere decir hongo, el cual hace referencia a un grupo de bacterias que comparten características entre sí. (Bonifaz, 2012).

En 1888, Edmund Nocard describió un actinomiceto, que fue aislado de una epidemia de muermo bovino en la Isla de Guadalupe, y en 1889, Vittore Trevisan, en honor a E. Nocard, crea el género *Nocardia* con *N. farcinica* como especie tipo; pero en 1980, Gordon y Mihm, remplazaron a *N. farcinica* por *N. asteroides* como la especie tipo (Llorenc & Ferreruela, URL:23).

El orden de los Actinomycetales fue reconocido hasta 1916, y se hizo evidente que está conformado por un gran grupo heterogéneo de microorganismos, aunque su posición filogenética como bacterias fue establecida hasta 1960. Actualmente considerado como uno de los más grandes Phylum (Actinobacteria) de las bacterias (Imagen 4) (Ul-Hassan & Wellington, 2009).

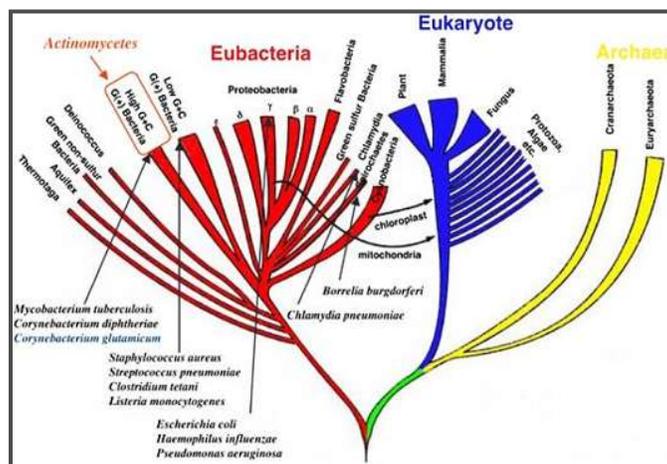


Imagen 4. Phylum actinobacteria (Franco, 2008).

### 3.1. Características generales

Los actinomicetos son un grupo heterogéneo de bacterias Gram positivas, ampliamente distribuidas, con alto contenido de Guanina y Citosina (G+C), que durante su crecimiento desarrollan células filamentosas que con el paso del tiempo se fragmentan en elementos cocoides y/o bacilares, constituyendo aproximadamente entre el 20-60% de la población microbiana del suelo (Serrano & Sandoval, 2005).

De las propiedades más significativas son; su capacidad para desarrollarse sobre sustratos que no pueden ser usados por otros microorganismos como; la quitina y la celulosa, y su capacidad para sintetizar numerosos metabolitos bioactivos, terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares capaces de degradar materia orgánica (Soler, 2012). Así como la capacidad de producir un olor a suelo húmedo por la producción de un metabolito llamado “geosmina” (Franco, 2008).

La mayoría son aerobios y heterótrofos, por lo cual pueden utilizar fuentes de carbono simples y complejas tales como; ácidos orgánicos, azúcares, polisacáridos, lípidos, proteínas e hidrocarburos alifáticos, y fuentes de nitrógeno como; amonio, nitratos, aminoácidos, peptonas y un gran número de proteínas (Franco, 2008).

A través de los años se han clasificado de diversas maneras; en un principio formaron parte de los hongos, tiempo después fueron clasificados como protistas inferiores (Bonifaz, 2012). Actualmente se encuentran ubicados como bacterias por varias razones como son:

- Núcleos procariotas (DNA distribuido libremente en la célula) (Arenas, 2011).
- La mayoría forman estructuras filamentosas; rectas, ondulantes, flexuosas y ramificadas con diámetro menor a 1  $\mu\text{m}$ , (Bonifaz, 2012).
- Son sensibles a los antibacterianos pero resistentes a los antifúngicos (Bonifaz, 2012).

- Presentan ácido murámico en la pared celular, lo que los hace Gram positivos, sin embargo géneros como: *Mycobacterium* y *Nocardia* sintetizan ceras y ácidos micólicos, que les confieren ácido-alcohol-resistencia (AAR).
- No contienen quitina ni celulosa, y sintetizan lisina a partir de ácido L-diaminopimélico (L-DAP) (Arenas, 2011).
- Presentan alto contenido de G+C (51 a 78%) (Franco, 2008).
- La composición de la pared celular varía según los géneros (Tabla 2) (Franco, 2008).

**Tabla 2.** Tipos de pared celular de los actinomicetos.

Tipos de pared celular	Aminoácido diaminado	Otras características	Género Tipo
I	L-DAP	Glicina	<i>Streptomyces</i>
II	meso-DAP u OH-DAP	Glicina	<i>Micromonospora</i> <i>Actinoplanes</i>
III	meso-DAP	Madurosa	<i>Actinomadura</i> <i>Dermatophilus</i> <i>Microbispora</i>
IV	meso-DAP	Arabinosa Galactosa	<i>Corynebacterium</i> <i>Mycobacterium</i> <i>Nocardia</i> <i>Rhodococcus</i>
V	Lisina	Ornitina Glutámico	<i>Actinomyces</i>
VI	Lisina  Ornitina	Galactosa Aspártico Serina Treonina Aspártico Glutámico	<i>Oerskovia turbata</i>  <i>Cellulomonas</i>
VII	L-DAP	Glicina	<i>Agromyces</i>

**L-DAP;** Ácido L-diaminopimélico. (Martínez, 2005)

Los géneros más importantes de los actinomicetos incluye aerobios y anaerobios como: *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, *Actinomadura*, *Streptomyces*, *Dermatophilus*, *Actinomyces*, *Arachnia* y *Rothia* (Tabla 3) (Serrano & Sandoval, 2005).

**Tabla 3.** Familias, Géneros y Características de los Actinomicetos.

Familia	Características	Contenido G+C %mol	Requerimiento de O <sub>2</sub>	Género
Actinomycetaceae	Filamentos ramificados con fragmentación, no presentan micelio aéreo, tienen paredes celulares variables de tipo V y VI.	55-67	Anaerobios	<i>Actinomyces</i> <i>Agromyces</i> <i>Arachnia</i> <i>Bacterionema</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Rothia</i>
Actinoplanaceae	Grupo A Sin micelio aéreo, pared celular tipo II, con presencia de zoosporas. Grupo B Micelio aéreo, pared celular tipo III, esporas con motilidad o sin ella, formadas dentro de un esporangio.	73	Aerobios	<i>Actinoplanes</i> <i>Ampullariella</i> <i>Dactylosporangium</i>  <i>Planobispora</i> <i>Planomonospora</i> <i>Spirillospora</i> <i>Streptosporangium</i>
Dermatophilaceae	Micelio dividido en todos los planos, sin micelio aéreo, pared celular tipo III, forma elementos motiles.	57-59	Aerobio	<i>Dermatophilus</i> <i>Geodermatophilus</i>
Frankiaceae	Simbióticas obligadas, formando nódulos en raíces de plantas no leguminosas que pueden fijar nitrógeno.	66-71	Anaerobios o microaerófilo	<i>Frankia</i> <i>Causserina</i> <i>Alnus</i> <i>Myrica</i>
Micromonosporaceae	Solamente presentan micelio vegetativo, con pared celular tipo II, forman esporas, son sensibles al calor.		Aerobio	<i>Micromonospora</i>
Mycobacteriaceae	Crecen como bacilos, filamentosos ramificados, ocasionalmente con micelio rudimentario. Pared celular tipo IV. Alto contenido en lípidos que incluye ácidos micólicos, ácido-alcohol-resistentes (AAR).	62-75	Aerobios	<i>Mycobacterium</i> <i>Micrococcus</i>

	Micelio vegetativo que se fragmenta, forma ácidos nocardiomicólicos. Pared celular tipo IV. Se pueden formar cadenas de esporas en el micelio vegetativo y aéreo.		<i>Rhodococcus</i> <i>Mycropolyspora</i> <i>Nocardia</i>
Nocardiaceae	Micelio aéreo y vegetativo no fragmentado, pared celular tipo I. Esporas presentes en micelio aéreo, que también pueden ser observadas en micelios vegetativos. Cadenas de artrosporas formadas dentro de una vaina. Esporas principalmente no motiles.	64-72	<i>Chainia</i> <i>Elytrosporangium</i> <i>Intrasporangium</i> <i>Kitasatoa</i> <i>Microellobisporia</i> <i>Streptoverticillium</i> <i>Streptomyces</i>
Thermomonosporaceae	Micelio aéreo y vegetativo que se fragmenta, pared celular tipo III (algunos IV). Esporas individuales, en pares o cadenas cortas, encerradas en vaina.	65-77	<i>Actinomadura</i> <i>Microbispora</i> <i>Microtetraspora</i> <i>Saccharomonospora</i> <i>Thermomonospora</i> <i>Nocardopsis</i>
No designados	<ul style="list-style-type: none"> <li>Micelio rudimentario, que fragmenta en elementos móviles. Gram-positivos.</li> <li>Sin micelio aéreo, el micelio vegetativo se fragmenta en elementos móviles, pared celular tipo IV.</li> <li>Sin micelio aéreo, presenta fragmentos de micelio vegetativo, producen esporas individuales. la pared celular contiene lisina pero no ácido aspártico</li> <li>Micelios aéreos y vegetativos no fragmentados, pared celular tipo IV, esporas formadas en micelio vegetativo y aéreo.</li> <li>Sin micelio vegetativo, pared celular tipo I, pedúnculos que soportan cadenas cortas de</li> </ul>	70-75	<i>Mycoplana</i> <i>Oerskovia</i> <i>Promicromonospora</i> <i>Pseudonocardia</i> <i>Sporichthya</i>

Tomado y modificado de: (Hidrin, y col., 2001) (Prescott, y col., 2002) (Serrano & Sandoval, 2005)

### **3.2. Hábitat**

Los actinomicetos se encuentran ampliamente distribuidos en una gran variedad de hábitats como; suelo, agua marina, agua dulce, aire, estiércol, sedimento de los ríos y fondo de los lagos. Encontrándose en casi todos los hábitats y bajo condiciones extremas disminuyen la concentración de la población. El tamaño de la comunidad depende, particularmente de algunas de las características físicas, del contenido de materia orgánica y del pH del medio ambiente (Franco, 2008).

Sin embargo nuevas especies han sido aisladas de una amplia gama de entornos, entre las que se incluyen; pinturas medievales, suelo del desierto, esponjas marinas, aguas termales, ambientes hipersalinos, etc. (Ul-Hassan & Wellington, 2009).

### **3.3. Condiciones de crecimiento**

Son descritos como organismos mesófilos, de lento crecimiento que no compiten con bacterias u hongos por el carbono disponible en el suelo. En el laboratorio crecen en medios como; agar nutritivo, agar soya tripticasa, agar sangre, agar infusión cerebro corazón, agar extracto de malta. Sin embargo, para la diferenciación, el desarrollo de esporas y/o pigmentos se necesita de medios suplementados con quitina coloidal, extracto de suelo, avena, almidón, sales inorgánicas, extracto de levadura, malta o peptona (Franco, 2008).

El crecimiento en medio sólido se puede observar entre 3 y 4 días de incubación pero el desarrollo de micelio aéreo con esporas puede tardar entre 7 y 14 días, y en algunas cepas hasta más de un mes. El crecimiento en medio líquido se restringe a la formación de una película en la superficie o un sedimento algodonoso, por lo cual se recomienda una agitación entre 200-250 rpm para suministrar una mejor aireación y fragmentación de las células (Franco, 2008).

### 3.4. Antecedentes de actinomicetos aislados de ambientes acuáticos

Nuestro planeta está conformado alrededor de 71% de la superficie de agua, y en ellas las primeras formas de vida tuvieron su origen (De la Rosa & Gamboa, 2004). Y actualmente las áreas poco exploradas como las galerías de las viejas minas, lagos salados, aguas contaminadas y sedimentos han atraído la atención de los investigadores en la búsqueda de actinomicetos (Naidenova & Vladimirova, 2002). Debido a que algunas especies de actinomicetos tienen importancia, por la capacidad de producir diversos metabolitos útiles en la industria farmacéutica, tales como; esteroides y antibióticos, motivo por el cual en las últimas décadas ha surgido un interés en la búsqueda de actinomicetos de diversos ambientes (Alonso, 2013). A pesar de que los actinomicetos aislados de suelo se siguen estudiando, las búsquedas se han reorientado hacia otros ambientes naturales como; los sedimentos de ríos, lagos y océanos, plantas y animales acuáticos, que ofrecen la posibilidad de encontrar especies no descritas anteriormente (Leiva y col., 2004).

Existen varios estudios en diferentes partes del mundo donde se han aislado e identificado actinomicetos provenientes de ambientes acuáticos, con el fin de obtener compuestos bioactivos, ejemplos de esto son los actinomicetos procedentes de Tamilnadu, Bahía de Bengala, India, en donde se aislaron; *Streptomyces*, *Actinopolyspora*, *Actinomadura*, *Nocardiopsis*, *Micromonospora* y *Actinomyces* (Manivasagan y col., 2010).

En las costas de Goa y Maharashtra, India, se aislaron los géneros; *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Catellatospora*, *Nocardia* y *Actinopolyspora*, de los cuales *Catellatospora* y *Actinopolyspora* presentaron actividad antimicrobiana (Kokare, Mahadik, & Kadam, 2004). Así como en Puducherry, se identificaron los siguientes géneros; *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Actinopolyspora*, *Saccharopolyspora*, *Microbispora*, *Actinomyces* y *Actinoplanes* (Suthindhiran & Kannabiran, 2010).

En el mar Amarillo, China se aislaron e identificaron mediante secuenciación del gen 16S rRNA los géneros; *Streptomyces*, *Arthrobacter*, y *Nocardiopsis* (Shumin & Liang, 2012).

También se han aislado actinomicetos de agua dulce en India como los pertenecientes a los géneros de *Streptomyces*, *Micromonospora* y *Nocardia* del río Nambul en Manipur (Ningthoujam y col., 2011).

En Yunnan, China se aislaron géneros como; *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Microtetraspora*, *Mycropolyspora*, *Saccharomonospora* y *Saccharopolyspora* (Jiang & Xu, 1989).

El río Nilo, Egipto, también presenta actinomicetos principalmente los géneros *Streptomyces* y *Micromonospora* (Rifaat, 2003).

En Sudáfrica, se aislaron actinomicetos del río Tyume los cuales pertenecen a los géneros de *Actinosynnema* y *Saccharopolyspora* (Sibanda y col., 2010).

En Alemania de esponjas marinas del mar Báltico, se aislaron actinomicetos, las cuales fueron identificadas mediante secuenciación del gen 16S rRNA, los géneros; *Actinoalloteichus*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Nocardiopsis* y *Streptomyces* (Schneeman y col., 2010).

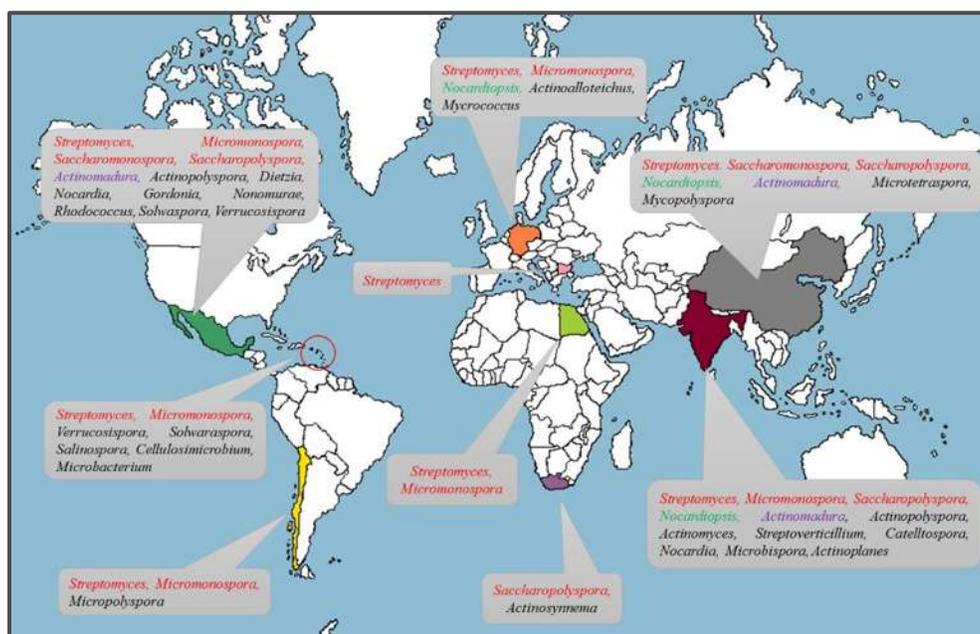
En Bulgaria; de ríos contaminados, se aislaron diferentes especies de *Streptomyces* (Naidenova & Vladimirova, 2002).

En Puerto Rico; *Verrucospora*, *Micromonospora*, *Solwaraspora*, *Streptomyces*, *Salinospora*, *Cellulosimicrobium* y *Microbacterium*, son los géneros encontrados en el sedimento y esponjas marinas (Vicentey col., 2013).

En Chile, en los lagos Riñihue, Tarahuín, Natri, Tepuhueico, se encontraron los géneros *Streptomyces*, *Micromonospora* y *Mycropolyspora* (Leiva y col., 2004).

En México se han estudiado; suelos salados, lagunas saladas, zonas costeras y zonas desérticas con el objetivo de aportar conocimiento sobre los actinomicetos halófilos en el país, siendo *Actinopolyspora* y *Saccharomonospora* los géneros predominantes (Ramírez y col., 2006). En Bahía de Todos Santos, Baja California, mediante secuenciación del gen 16S rRNA se identificaron los géneros; *Streptomyces*, *Micromonospora* y *Nocardia* (Becerril-Espinosa y col., 2012). Y en el Golfo de California y México los géneros: *Actinomadura*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Micromonospora*, *Nonomuraea*, *Rhodococcus*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Salinospora*, *Streptomyces*, *Solwaspora* y *Verrucosipora* (Maldonado y col., 2008).

En la Imagen 5 se muestran los países en los cuales se han aislado actinomicetos de sedimento marino así como de sedimento de ríos o lagos.



**Imagen 5.** Países que han aislado actinomicetos de diversos sedimentos.

En color rojo se muestran los principales géneros actinomicetos identificados en los diferentes países. Seguido de los géneros que se muestran en color verde y morado, el resto de los géneros presenta una distribución restringida.

#### 4. Taxonomía

La taxonomía es la ciencia de la clasificación biológica que agrupa a los organismos según sus afinidades o similitudes. Teniendo como objetivo describir y diferenciar la gran diversidad de especies bacterianas (Molina, 2010).

Los dos principales esquemas de clasificación son; 1) Fenotípico; basado en las características observables de un organismo como son; características morfológicas, comportamiento en medios de cultivo, propiedades bioquímicas, fisiológicas y nutricionales. 2) Filogenético; teniendo en cuenta las relaciones evolutivas de los microorganismos haciendo uso de la ubicuidad del gen 16S rRNA el cual muestra las divergencias evolutivas entre los microorganismos (Gobernado & López-Hontangas, 2003).

Al clasificar a los organismos en jerarquías taxonómicas y nombrarlos, por ejemplo (Tabla 4) facilitamos la comunicación sobre los diversos aspectos de cada organismos, lo que incluye su comportamiento, ecología, fisiología patogénesis y sus relaciones evolutivas (Madigan, y col., 2009).

**Tabla 4.** Jerarquías taxonómicas.

Categoría	Ejemplos	
Dominio	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>
Clase	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>
Subclase	<i>Actinobacteridae</i>	<i>Actinobacteridae</i>
Orden	<i>Actinomycetales</i>	<i>Actinomycetales</i>
Suborden	<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Corynebacterineae</i>
Familia	<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Nocardiaceae</i>
Género	<i>Actinomyces</i>	<i>Nocardia</i>
Especie	<i>Actinomyces bovis</i>	<i>Nocardia asteroides</i>

(Castro & Lugo, 2005) (Martínez, 2005)

#### **4.1. Especie bacteriana**

En la actualidad no solo se considera como especie a una colección de cepas que presentan un alto grado de similitud en una serie de rasgos independientes, sino también como una unidad fundamental de ecología y evolución con un comportamiento dinámico, tomando en cuenta datos fenotípicos y filogenéticos (Sandoval y col., 2007).

En los últimos años se han empleado técnicas de biología molecular para delimitar especies. Determinando que las cepas de la misma especie, definida fenotípicamente, comparten 70% o más de su genoma y que cepas de diferentes especies comparten menos del 70% (Sandoval y col., 2007).

Los datos recientes de divergencia de las secuencias de genes, como el; 16S rRNA, han mostrado que especies diferentes presentan un diferencia de más del 3% en la secuencia del gen 16S rRNA, mientras que cepas con menos del 3% de diferencia se pueden considerar como miembros de una misma especie (Sandoval y col., 2007).

## 5. Filogenia

Filogenia proviene del griego “*phylon*” que significa raza, y “*genia*”, que hace referencia al nacimiento o generación, determinando la historia evolutiva de los organismos (Rodríguez, 2012). Permitiendo conocer las interrelaciones entre las especies, y a partir de ahí intentar entender los procesos y mecanismos evolutivos que han originado y mantenido la diversidad biológica (Zardoya, 2010).

De este modo consideramos a la filogenética como el estudio de la filogenia utilizando diagramas tipo árbol para representar los ancestros de los organismos (Rodríguez, 2012). Ya que utiliza la comparación de secuencias de nucleótidos, lo que revela el proceso evolutivo donde los seres biológicos son el resultado de una descendencia con modificación entre especies ancestrales y descendientes (Peña, 2011).

### 5.1. Análisis filogenético

Los análisis filogenéticos, se usan cada vez más en la taxonomía bacteriana para completar la información fenotípica y genotípica, permitiendo clasificar a los microorganismos en un sistema conforme a sus relaciones evolutivas, debido a que las clasificaciones filogenéticas son una medida de divergencia genética de distintos phyla (Brooks y col., 2008).

La secuenciación de DNA se ha convertido en un procedimiento de rutina y la comparación de secuencias de DNA de genes divergentes muestra una medida de su parentesco. En consecuencia, las diferencias en secuencias de DNA de genes que divergen con rapidez pueden usarse para establecer la distancia genética de grupos de bacterias muy relacionados y las diferencias en secuencias entre genes que divergen con lentitud pueden usarse para medir la cercanía entre grupos de bacterias muy divergentes (Brooks y col., 2008).

### **Análisis de genes individuales**

Las comparaciones de secuencias de genes individuales pueden proporcionar información valiosa. Como es el uso del gen 16S rRNA que ha mostrado ser muy útil en la taxonomía, sobre todo para la identificación y descripción de nuevas especies. Sin embargo la dependencia de la secuencia de un solo gen, puede presentar riesgos. Ya que la poca divergencia del gen 16S rRNA puede limitar su eficacia en la discriminación de bacterias a nivel de especie (Madigan y col., 2009).

### **Análisis de secuencias múltiples**

El uso de múltiples genes para la identificación bacteriana puede evitar problemas vinculados al uso de genes individuales. La secuenciación de una serie de genes no relacionados permite realizar un muestreo del genoma más representativo que el uso de un único gen (Madigan y col., 2009).

## **5.2. Cronómetros moleculares**

Las macromoléculas de los seres vivos como son: los ácido nucleicos y las proteínas van cambiando con el tiempo, por lo cual se les considera como cronómetros moleculares. Asumiendo que los cambios se producen al azar y que aumentan con el tiempo de manera lineal, los cuales al mostrar diferencias en las secuencias de nucleótidos, reflejan la distancia evolutiva existente entre los organismo (Rodicio & Mendoza, 2004).

Sin embargo el principal problema del cronómetro molecular es que las secuencias de DNA cambian a ritmos distintos, lo que dificulta establecer una correlación directa y fiable (Madigan y col., 2009).

### 5.3. Genes utilizados en el análisis filogenético

Los genes más útiles y usados para definir las relaciones entre los organismos son; el 16S rRNA y el 23S rRNA. Ya que ambos están muy conservados y han cambiado lentamente, proporcionando una visión de la evolución de todos los organismos vivos (Madigan y col., 2009).

#### Gen 16S rRNA

Es un polirribonucleótido de la subunidad pequeña del rRNA que se han utilizado para el análisis filogenético basado en que posee una serie de características que lo hacen útil para la identificación bacteriana (Patel, 2001).

- Es una molécula antigua presente en todas las bacterias.
- Su estructura y función se ha mantenido estable durante largos periodos de tiempo (Patel, 2001).
- Está lo suficientemente conservado por la cual actúa como cronómetro molecular (Bou y col., 2011).
- Es lo suficientemente grande (1500 pb) conteniendo secuencias de información relevante, sin embargo lo más importante es que se compone de aproximadamente 50 dominios funcionales (Patel, 2001).
- La conservación de la estructura secundaria, ayuda en las comparaciones, sirviendo de base para el alineamiento preciso.
- Debido a su fácil secuenciación, existen amplias bases de datos (Perea, 2004).

Las regiones altamente conservadas agrupan a las bacterias en altos órdenes taxonómicos, mientras que las regiones variables permiten una clasificación a nivel de género y especie (Gobernado & López-Hontangas, 2003).

## Gen 23S rRNA

El gen de la subunidad grande del 23S rRNA, es una buena alternativa ya que su secuencia más larga (3000 pb) proporciona información útil a los fines taxonómicos y filogenéticos en los casos en los que la fracción 16S rRNA no proporcione resultados concluyentes (Bou y col., 2011).

También es considerado un marcador filogenético de los actinomicetos ya que dentro del gen 23S rRNA, se encuentra un inserto de aproximadamente 100 pb, el cual es un marcador característico para las bacterias de alto contenido de G+C en el DNA (Roller y col., 1992).

## 5.4. Secuenciación

La secuenciación se refiere a la determinación del orden de los nucleótidos en una molécula de DNA o RNA, los cuales resultan útiles cuando se analizan grupos de microorganismos ya que se pueden determinar las áreas de conservación y variabilidad (Madigan y col., 2009).

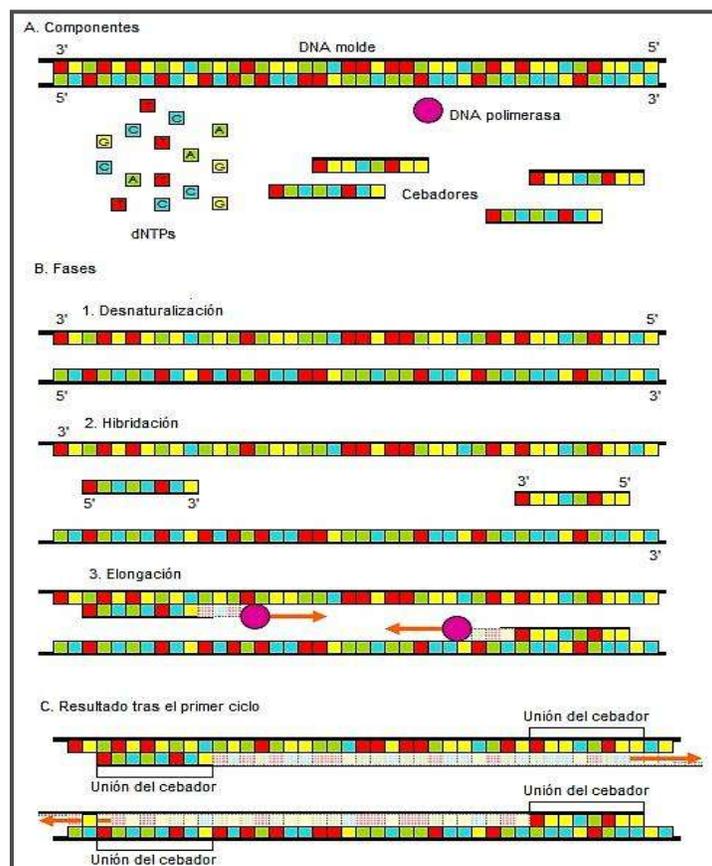
Los estudios filogenéticos modernos se basan en comparaciones de secuencias de nucleótidos, para los cuales se han desarrollado métodos, como: la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR), la cual hace uso de la bioquímica básica de la replicación de DNA con el fin de amplificar una región específica del DNA, mediante el uso de oligonucleótidos sintéticos (Koneman, y otros, 2008), por lo cual es importante el diseño de los primers. Sin embargo existen primers estándar para varios genes conservados, como son; 27f y 1492r (Tabla 5), que permiten la amplificación del gen 16S rRNA de gran cantidad de bacterias (Madigan y col., 2009).

**Tabla 5.** Secuencias de los cebadores estándar 27f y 1492r.

Primer	Secuencia del Primer
27f	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
1492r	5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

La PCR, se constituye por el DNA, los dos primers, el magnesio, los desoxinucleótidos trifosfato (dNTP's), la Taq polimerasa, la solución reguladora a pH 8.0-8.5 y tres fases repetitivas; (Imagen 6) (Jiménez, 2005).

- **Desnaturalización;** se separa de la doble cadena de DNA, (94 °C).
- **Hibridación;** se unen los primers al DNA que se va amplificar (50 °C - 60 °C).
- **Elongación;** se incorporan dNTP's a partir del extremo 3' donde se han hibridado los primers (72 °C) (Pérez de Castro, URL:40).



**Imagen 6.** Reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) (Pérez de Castro, URL:40).  
 A) Componentes de la PCR. B) Fases de la PCR. C) Resultado tras el primer ciclo.

## Análisis de secuencias

El análisis de secuencias, consiste en descubrir similitudes funcionales y estructurales, mediante la comparación de las secuencias desconocidas con las conocidas. El análisis incluye la alineación, proceso por el cual, se comparan las secuencias mediante la búsqueda de patrones para localizar las inserciones, deleciones o cambios puntuales en los nucleótidos que se hayan podido producir en el proceso de divergencia (Meneses y col., 2011). Cuando dos secuencias quedan alineadas producen alineamientos de tres tipos:

- **Emparejamientos (match);** es cuando un nucleótido ocupa una posición idéntica en las dos secuencias.
- **No emparejamientos (mismatches);** se origina cuando el emparejamiento se produce entre nucleótidos diferentes.
- **Huecos (gaps);** se origina cuando un nucleótido se empareja con una base nula, debido a que se ha producido una inserción o una deleción en una de las secuencias (Martínez & González).

El alineamiento de secuencias (Imagen 7) es esencial, ya que la asignación de mismatches y gaps constituyen una parte fundamental sobre cómo han divergido las secuencias desde se ancestro (Madigan y col., 2009).

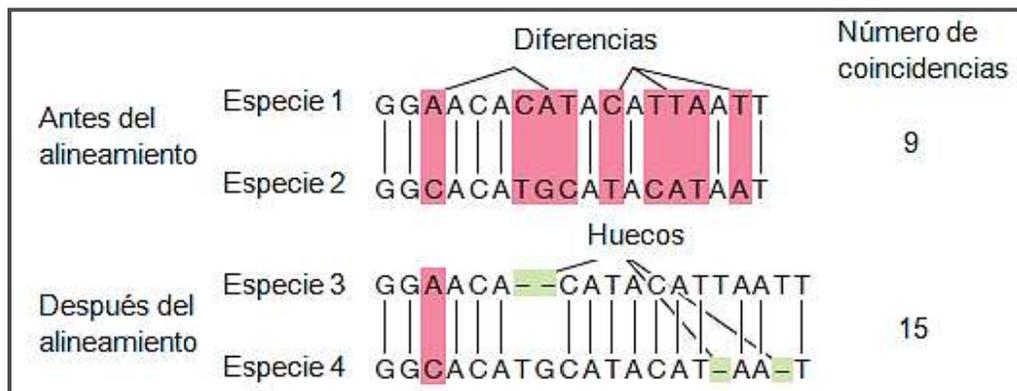
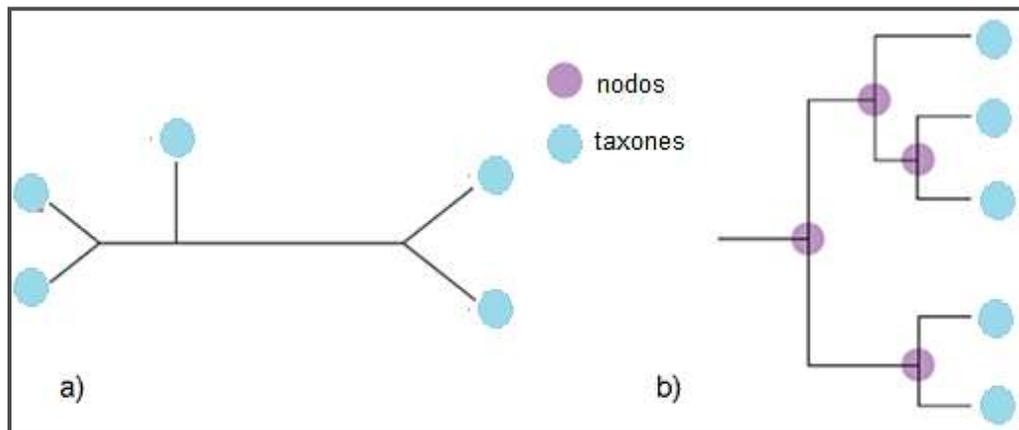


Imagen 7. Alineamiento de secuencias (Madigan y col., 2012).

## 5.5. Árboles filogenéticos

Un árbol filogenético (Imagen 8) es la representación esquemática de las entidades biológicas que están relacionadas por un ancestro común, siendo construidos a partir de la comparación de; DNA, RNA o proteínas (Mendoza-Revilla, 2012). La longitud de las ramas es proporcional al tiempo transcurrido tras la divergencia a partir de un ancestro común y la tasa de evolución de las secuencias analizadas (Zardoya, 2010).



**Imagen 8.** Árboles filogenéticos (Madigan y col., 2012).

Los nodos terminales representan los taxones y los internos los ancestros. a) Árbol sin raíz, muestra las relaciones entre las cepas analizadas. b) Árbol con raíz, muestra el camino evolutivo desde el ancestro hasta cada una de las cepas

Los métodos para la construcción de árboles filogenéticos se puede dividir en dos categorías:

- 1) Método usando matrices de distancia:

**Neighbor-Joining (NJ);** este método genera una matriz de distancia, que cuando se trabaja con secuencias, se genera al contar las diferencias de nucleótidos entre todos los pares de secuencias. Posteriormente el árbol es generado al unir las secuencias que posean la menor cantidad de diferencias o menor distancia genética (Mendoza-Revilla, 2012).

## 2) Métodos basados en datos discretos:

**Máxima Parsimonia (MP);** trata de elegir un árbol que pueda explicar las diferencias en las secuencias observadas utilizando el menor número de cambios. Por lo cual, genera secuencias ancestrales, secuencias que puedan dar origen a las secuencias observadas, y asigna diferentes puntajes a los distintos árboles formados. El puntaje de cada árbol indica el número de mutaciones que son necesarias para dar origen a las secuencias. De esta forma el árbol con menor puntaje se conoce como el árbol más parsimonioso, ya que necesita menos cambios para explicar el origen de todas las secuencias (Mendoza-Revilla, 2012).

**Maximum Likelihood (ML);** trata de encontrar el árbol que explique las relaciones entre las diferentes secuencias con la mayor probabilidad. Para esto utiliza un modelo evolutivo y cambiando sus parámetros, por ejemplo modificando el orden y longitud de las ramas e incluyendo diferentes probabilidades de sustituciones, encuentra la mayor verosimilitud para un árbol dado. Después lo altera, moviendo una rama y colocándola en otro sitio, volviendo así a modificar sus parámetros hasta encontrar un árbol que no se pueda modificar (Mendoza-Revilla, 2012).

**Inferencia Bayesiana (IB);** método es muy parecido al de ML. En ambos métodos se exploran los posibles árboles, moviéndose de un árbol a otro al cambiar los parámetros de lugar y longitud de las ramas y calculando la verosimilitud de cada árbol; pero una de las diferencias entre ML e IB, es que IB incluye una probabilidad *a priori*, es decir una probabilidad para cada hipótesis, sin tener en cuenta las secuencias. De esta manera la hipótesis óptima sea el árbol elegido, es la que maximiza la probabilidad *a posteriori*, siendo esta la verosimilitud multiplicada por la probabilidad *a priori* (Mendoza-Revilla, 2012).

## 6. Justificación

En Michoacán no existen estudios sobre la biodiversidad microbiana de actinomicetos presentes en los diversos cauces naturales que existen en el estado, motivo por el que se decidió muestrear la cascada de “Chorro Prieto” ubicada en Ichaqueo, Michoacán; para caracterizar mediante técnicas de biología molecular la microbiota, específicamente de los actinomicetos que habitan en el sedimento de dicho lugar.

Los actinomicetos son microorganismos poco estudiados, los cuales han adquirido importancia en las últimas décadas, gracias a la elevada actividad metabólica que poseen, ya que tienen la capacidad de degradar diversos sustratos, producir diversos compuestos bioactivos con múltiples funciones; como son antimicrobianos, antifúngicos, antitumorales, entre otros, por lo cual se pueden utilizar en diversos procesos industriales, ambientales, médicos etc., debido a que los actinomicetos aislados de un ambiente silvestre tienen una actividad metabólica mayor para competir con los diversos microorganismos con los cuales coexisten.

El interés por caracterizar a los actinomicetos se centra principalmente en que los diversos microorganismos han adquirido resistencia a los actuales terapéuticos, motivo por el cual se buscan nuevas alternativas, en este caso en los actinomicetos que son los mayores productores naturales de compuestos bioactivos, y de esta forma hacer uso de las herramientas biotecnológicas para implementar nuevas drogas terapéuticas al mercado, buscando disminuir los costos de producción.

Motivo por el cual; en el Laboratorio de Microbiología (QFB-UMSNH), en colaboración con el Laboratorio Producción de Biológicos (UAM-X) y el Laboratorio de Investigación en Microbiología Médica y Ambiental (FM-UAMex); se desarrolló la primera investigación en el estado para identificar parte de la biodiversidad microbiana de los sedimentos de los cauces naturales de agua dulce para un posterior aprovechamiento y a su vez establecer si existen especies únicas o no descritas anteriormente.

## **7. Hipótesis**

En el micro-hábitat que se forma en el sedimento de la cascada de “Chorro Prieto en Ichaqueo, Michoacán; existen diversas especies de actinomicetos las cuales nunca han sido estudiadas.

## **8. Objetivos**

### **8.1. Objetivo general**

- Aislar y caracterizar a los actinomicetos del sedimento de la cascada “Chorro Prieto”, ubicada en Ichaqueo, municipio de Morelia, Michoacán, haciendo uso de técnicas de biología molecular.

### **8.2. Objetivos particulares**

- Aislar actinomicetos presentes en el sedimento de la cascada de “Chorro Prieto” de Ichaqueo, Michoacán.
- Comprobar que las especies aisladas corresponde al orden de los Actinomicetales, amplificando el marcador filogenético característico de los actinomicetos presente en el gen 23S rRNA.
- Identificar genéticamente las especies de actinomicetos aislados mediante; amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA.
- Realizar un análisis filogenético de las especies encontradas en el sedimento de la cascada de “Chorro Prieto”.

## 9. Diseño de la investigación

- Observacional
- Transversal
- Retrospectivo
- Experimental

## 10. Muestras

El muestreo se realizó el día 5 de Febrero del 2012, entre las 12:30-13:30 horas, y se determinaron las siguientes propiedades físicas-químicas; temperatura y pH del agua, distancia desde el borde de la cascada al punto de muestreo y profundidad, posteriormente en el laboratorio se determinó el pH del sedimento y el porcentaje de cloruro de sodio.

Se tomaron 8 muestras de sedimento y agua en distintos puntos del cauce de la cascada “Chorro Prieto” ubicada en Ichaqueo, Michoacán a una altura de 2440 msnm. Las muestras fueron depositadas en frascos de toma de muestra y en tubos Falcón® estériles, los cuales se colocaron en un refrigerador portátil.

## 11. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

**Criterios de inclusión:** todas las cepas que presentaban características macroscópicas y microscópicas características de los actinomicetos.

**Criterios de exclusión:** las cepas que no presentaban características macroscópicas y microscópicas propias de los actinomicetos.

**Criterios de eliminación:** 5 cepas que dejaron de crecer.

## 12. Materiales y Métodos

### 12.1. Materiales utilizados

- Matraces Erlenmeyer PYREX® (1000 mL, 500 mL, 125 mL, 100 mL)
- Probeta KIMAX® (500 mL, 100 mL, 50 mL)
- Embudos de cristal PYREX®
- Vasos de precipitado KIMAX® (500 mL, 300 mL)
- Cajas pretri
- Frascos de toma de muestra
- Tubos Falcón®
- Tubos cónicos con tapón de rosca
- Tubos Eppendorf (1,5 mL, 0,2 mL)
- Puntas para micropipeta (200 µL, 1000 µL)
- Pipetas (10 mL, 5 mL)
- Tubos de cristal con tapón de rosca
- Espátulas y/o cucharillas
- PARAFILM “M”®
- Pissetas y/o aspersores
- Crioviales

### 12.2. Reactivos utilizados

- Agua destilada
- Medio de cultivo
  1. Infusión de Cerebro Corazón (BHI) BD Bioxon®
  2. Extracto de Malta (Modificado Karla G. Domínguez, Fernando Villalón, Ricardo J. Soria).
- Soluciones desinfectantes:
  1. Alcohol al 70%
  2. Cloro al 8%

3. Lysol

- Kit para tinción Gram (HYCEL)
  1. Cristal violeta
  2. Safranina
  3. Lugol
  4. Alcohol-cetona
- Aceite para inmersión
- Kit para extracción del DNA (Wizard® Genomic DNA Purification Kit)
  1. EDTA
  2. Lisozima
  3. Solución de lisis nuclear
  4. Solución de RNasa
  5. Solución Precipitadora de proteínas
  6. Isopropanol
  7. Etanol al 70%
  8. Solución rehidratante de DNA
- Reactivos para la amplificación del inserto del gen 23S rRNA y 16S rRNA
  1. Agua destilada para HPLC estéril
  2. Buffer de amplificación
  3. Cloruro de magnesio
  4. dNTP's mix
  5. Primer 23S f
  6. Primer 23S r
  7. Taq polimerasas
  8. Primer 27 f
  9. Primer 1492 r
- Reactivos para la electroforesis
  1. Agarosa
  2. TAE 1X
  3. Bromuro de Etidio
  4. Gel Loading Solution I, 6X de Maxim Biotech, Inc.
  5. Marcador de pb; 1 kb ladder plus M1191/M1192 (100-10,000 pb).

### 12.3. Equipos utilizados

- Incubadora Riossa®
- Incubadora con agitación IKA® KS 3000 i
- Centrífuga clínica Globe Table-Top Electric Centrifuge
- Microcentrífuga Labnet
- Refrigerador
- Congelador Tor Rey®
- Campana de flujo laminar CV-2 ECOSHEL
- Microscopio óptico
- Balanza granataría
- Balanza analítica ADAM®
- Termociclador Cleaver Scientific
- Cámara de electroforesis Cleaver Scientific
- Fotodocumentador Syngene® con cámara fotográfica acoplada Canon
- Computadora hp
- Cámara fotográfica Samsung
- Micropipetas Proline® (volúmenes variables)
- Parrilla eléctrica con agitador magnético Thermo Scientific
- Autoclaves All American
- Asas bacteriológicas
- Mecheros (Bunsen, Fisher, Eléctrico)
- Agitadores magnéticos
- Vortex Mixer Maxi-Mix®
- Baño maría
- Refractómetro ATAGO
- Potenciómetro
- Microondas DAEWOO
- Ultra congelador Jouan

#### 12.4. Método para aislar actinomicetos de la cascada de “Chorro Prieto”

Para aislar a los actinomicetos presentes en las muestras del sedimento de la cascada de “Chorro Prieto”, Ichaqueo, Michoacán, a cada una de las muestras se le realizó un tratamiento para inhibir el desarrollo de otros microorganismos, así como fomentar el desarrollo de los actinomicetales, la metodología fue la siguiente:

1. Colocar tierra de cada una de las muestras lo que equivale a 1 mL de agua en un tubo de ensaye.
2. Agregar agua hasta completar 10 mL para tener un dilución  $10^{-1}$ .
3. Realizar dilución  $10^{-2}$ , tomando 100  $\mu\text{L}$  de la solución  $10^{-1}$  y adicionar 900  $\mu\text{L}$  de una solución de extracto de levadura 3% (YE), y dodecilsulfato de sodio 1% (SDS).
4. Mezclar e incubar en baño maría durante 20 min a 40 °C (Hayakawa & Nonomura, 1989).
5. Tomar 30  $\mu\text{L}$  de la dilución, y colocar sobre placas de agar BHI y Extracto de Malta.
6. Realizar siembra masiva con asas en “L”.
7. Incubar las placas a 37 °C, y revisar cada 24 h hasta completar 72 h para observar la presencia de crecimiento.
8. Dejar a temperatura ambiente en un lugar oscuro, durante 24 h más.
9. Seleccionar las colonias con morfología característica de actinomicetos.
10. Realizar tinción Gram para observar morfología y afinidad tintorial.
11. Resembrar colonias con características macroscópicas y microscópicas de los actinomicetos en placas de Extracto de Malta.

#### 12.5. Obtención de biomasa

1. Sembrar cepas en medio líquido extracto de malta.
2. Incubar a 37 °C varios días (7-15 días).
3. Colocar cultivo líquido en tubo de rosca.

4. Centrifugar a 10,000 rpm durante 5 min.
5. Retirar sobrenadante.
6. Repetir pasos 1, 2, y 3 cuantas veces sea necesario.
7. Retirar sobrenadante, dejando entre 2-3 mL.
8. Pasar 1000  $\mu$ L a un tubo eppendorf de 1,5 mL.
9. Centrifugar 14,000 rpm durante 3 min.
10. Remover sobrenadante.
11. Congelar hasta extracción de DNA.

## 12.6. Extracción de DNA

Para la extracción de DNA se utilizó el protocolo especificado por el fabricante Wizard® Genomic DNA Purification Kit de Promega, el cual indica:

1. Obtener biomasa como se menciona en la metodología 12.5.
2. Resuspender biomasa congelada en 480  $\mu$ L de EDTA 50 mM.
3. Agregar 120  $\mu$ L de Lisozima, mezclar suavemente con la pipeta.
4. Incubar muestra a 37 °C por 60 min.
5. Centrifugar a 14,000 rpm durante 2 min y remover el sobrenadante.
6. Agregar 600  $\mu$ L de Solución de Lisis Nuclear y homogeneizar suavemente.
7. Incubar a 80 °C durante 5 min para lisar las células.
8. Atemperar.
9. Agregar 3  $\mu$ L de Solución de RNasa y mezclar invirtiendo el tubo de 2-5 veces.
10. Incubar a 37 °C durante 60 min.
11. Atemperar la muestra.
12. Agregar 200  $\mu$ L de Solución Precipitadora de Proteínas.
13. Agitar vigorosamente 20 s en vórtex.
14. Incubar muestra en hielo durante 5 min.
15. Centrifugar a 14,000 rpm por 3 min.



4. Retirar del termociclador
5. Guardar en refrigeración a 4 °C hasta momento de realizar electroforesis.

### 12.8. Amplificación del gen 16S rRNA

1. Preparar mezclas de reacción como se indica a continuación:

Agua para HPLC	15.0 µL
Buffer de amplificación	2.5 µL
Cloruro de Magnesio	1.5 µL
dNTP's mix	0.5 µL
Primer 27 f	1.0 µL
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 45 µl Agua HPLC estéril</li> <li>• 5µl Primer 27f concentrado</li> </ul>	
5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	
Primer 1492r	1.0 µL
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 45 µl Agua HPLC estéril</li> <li>• 5 µl Primer 1492r concentrado</li> </ul>	
5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'	
Taq DNA polimerasa	0.5 µL
DNA muestra	3.0 µL

2. Colocar muestras en termociclador.
3. Indicar programa 16S;
 

Desnaturalización inicial	94 °C	5 min	1 ciclo
Desnaturalización	94 °C	30 s	
Hibridación	46 °C	60 s	29 ciclos
Polimerización final	72 °C	50 s	
Elongación	72 °C	5 min	1 ciclo
4. Retirar del termociclador.
5. Guardar en refrigeración a 4 °C hasta momento de realizar la electroforesis.

### 12.9. Electroforesis

1. Preparar gel de agarosa (2% 23S rRNA, 1% 16S rRNA) en TAE 1X.
2. Calentar hasta ebullición.
3. Vaciar en molde con peine.
4. Dejar gelificar.
5. Colocar gel en cámara de electroforesis.
6. Cubrir con TAE 1X.

7. Mezclar muestra con buffer de carga.
8. Colocar muestras en los pocillos.
9. Colocar marcador de pares de bases; (1kb ladder plus M1191/M1192 para 23S rRNA, 1kb ladder DNA Marker de Axygen para 16S rRNA).
10. Cerrar cámara de electroforesis.
11. Conectar los electrodos.
12. Encender y dejar circular voltaje (120 volts durante 45 min).
13. Sumergir gel en solución de bromuro de etidio 5-10 s.
14. Observar fluorescencia del DNA con una lámpara de luz ultravioleta.
15. Fotodocumentar.
16. Identificar banda del amplicon.

#### **12.10. Purificación de productos de PCR para secuenciación**

1. Colocar Amicon Ultra filter en tubo para microcentrífuga.
2. Colocar amplicon en Amicon Ultra filter.
3. Colocar 400  $\mu$ L de agua para HPLC estéril.
4. Centrifugar a 14,000 rpm durante 30 min.
5. Desechar tubo con volumen recuperado.
6. Colocar Amicon Ultra filter invertido en tubo limpio.
7. Centrifugar 10,000 rpm durante 2 min.
8. Realizar electroforesis con 2  $\mu$ L del purificado en gel de agarosa al 1%.
9. Observar banda limpia en 1500 pb al momento de fotodocumentar.
10. Rotular el tubo con el producto recuperado.
11. Enviar secuenciar a Macrogen Maryland, USA.

#### **12.11. Identificación**

1. Abrir las secuencias “F” y “R” en BioEdit.
2. Revisar la secuencia y corregir N’s intermedias tanto en “F” como en “R”.

3. Eliminar N's de los extremos.
4. Copiar las secuencias "F" y "R" corregidas en una nueva ventana.
5. Seleccionar secuencia "F" y "R".
6. Seleccionar Accessory Application y hacer CAP contig assembly program.
7. Seleccionar el resultado (contig 0).
8. Seleccionar Edit, escoger Copy sequences to clipboard (Fasta Format).
9. Pegar en archivo de Word o texto sin formato.
10. Copiar y pegar secuencia en formato Fasta, en las diferentes bases de datos; National Center for Biotechnology Information (NCBI), EzTaxon, Ribosomal Database Project (RPD) y Bio Informatic Bacteria Identification (leBIBI).
11. Elegir las cepas que tengan una similitud  $\geq 97\%$  con la cepa problema.

### **12.12. Construcción del árbol filogenético**

1. Hacer archivo con las secuencias identificadas y secuencias de cepas tipo.
2. Abrir en BioEdit.
3. Seleccionar todas las secuencias.
4. Alinear en Clustal W Multiple Alignment.
5. Cortar extremos hasta donde se alinean todas las secuencias.
6. Guardar en format fasta.
7. Abrir en MEGA 5.2.
8. Hacer análisis filogenéticos.
9. Construir árbol en Máxima Parsimonia.
10. Identificar de acuerdo a la homología de secuencias.

### **12.13. Crioconservación**

1. Sembrar sobre placas de extracto de Malta.
2. Incubar a 37 °C, hasta obtener crecimiento considerable (7-15 días).
3. Cortar con bisturí estéril tiras del medio de cultivo donde hay crecimiento.
4. Colocar tiras en crioviales.

5. Adicionar 1500  $\mu\text{L}$ , de medio con 20% de glicerol estéril.
6. Cerrar y etiquetar adecuadamente el crioviales.
7. Conservar a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$

#### **12.14. Conservación en suelo estéril modificado**

1. Colocar 4 g de suelo modificado en tubo de rosca y esterilizar, 3 h a
2. Esterilizar, 3 h a  $121^{\circ}\text{C}$  y 15 lbs.
3. Sembrar en medio de cultivo líquido (extracto de malta)
4. Incubar a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  varios días (7-15) hasta crecimiento considerable.
5. Obtener la biomasa como se menciona en la metodología 13.5.
6. Lavar biomasa con agua estéril.
7. Resuspender biomasa lavada con 1000  $\mu\text{L}$  de agua estéril.
8. Colocar 1000  $\mu\text{L}$  de la biomasa resuspendida en el tubo con suelo estéril.
9. Cerrar tubo, colocar parafilm sobre el tapón, y etiquetar adecuadamente.
10. Almacenar los tubos en un lugar oscuro, fresco y seco.

## 13. Resultados y Discusión

### 13.1. Características de las muestras de sedimento de Ichaqueo, Michoacán.

A cada una de las 8 muestras tomadas del sedimento de la cascada “Chorro Prieto”, ubicada en Ichaqueo, Michoacán, se les determinó una serie de características físico-químicas (Tabla 6), para de esta forma determinar las condiciones existentes en las cuales se desarrolla la diversidad de actinomicetos de Ichaqueo.

**Tabla 6.** Características de las muestras tomadas en la cascada "Chorro Prieto", Ichaqueo, Michoacán.

Muestra	T°C Agua	pH Agua	Borde del arroyo- Punto de muestreo	Profundidad	pH Sedimento	% NaCl
M-1	13.5 °C	7.5	120 cm	62 cm	5.70	1
M-2	13.0 °C	7.6	242 cm	42 cm	6.50	1
M-3	13.0 °C	7.8	110 cm	67 cm	6.25	1
M-4	12.9 °C	7.3	110 cm	58 cm	5.64	1
M-5	13.2 °C	7.5	110 cm	30 cm	6.16	1
M-6	12.7 °C	7.4	120 cm	31 cm	6.25	2
M-7	13.7°C	7.8	110 cm	40 cm	6.20	2
M-8	13.3 °C	7.4	120 cm	35 cm	6.20	2

Los actinomicetos son microorganismos mesófilos y crecen principalmente a temperaturas entre 25-30 °C, sin embargo se encuentra presentes en rangos de temperatura entre 5-55 °C, como lo menciona; Franco en 2008, lo cual tiene importancia debido a que las muestras tomadas presentaban una temperatura promedio de 13.1625 °C, la cual es una temperatura inferior a la ideal para el desarrollo de estos microorganismos, sin embargo considerando que era el periodo invernal, es un temperatura aceptable para su desarrollo.

Como menciona; Arenas en 2011, los actinomicetos se desarrollan principalmente a un pH neutro o ligeramente alcalino, por lo cual el pH neutro del punto de muestreo favorece el desarrollo de actinomicetos, sin embargo con el paso del tiempo el pH de las muestras se acidificó ligeramente.

### 13.2. Morfología macroscópica y microscópica de las cepas aisladas de Ichaqueo, Michoacán

A continuación en la Tabla 7, se presenta la descripción de la morfología macroscópica y microscópica de las 39 cepas aisladas del sedimento de la cascada de “Chorro Prieto”, ubicada en Ichaqueo, Michoacán; las cuales se seleccionaron por presentar morfología tanto macroscópica como microscópica propia de los actinomicetos así como otras características de dicho grupo de microorganismos: colonias crateriformes, filamentos largos y/o bacilos Gram positivos, producción de “geosmina” (olor a tierra mojada), producción de micelio vegetativo, producción de micelio aéreo, lento desarrollo, entre algunas otras. Características que coinciden con lo descritas en: *Identificación y diagnóstico de actinomicetales patógenos* (Serrano & Sandoval, 2005), *Propiedades generales de los actinomicetos* (Bonifaz, 2012) y *Generalidades de actinomicetos* (Arenas, 2011).

**Tabla 7.** Resultados de la morfología macroscópica y microscópica de las cepas aisladas del sedimento de la cascada "Chorro Prieto" en Ichaqueo, Michoacán.

#### U-NICO-2



**a)** Morfología macroscópica; colonias, crateriformes, irregulares, elevadas, friables, de color beige mate.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos delgados, largos, que se aglomeran, con ramificaciones, Gram positivos.

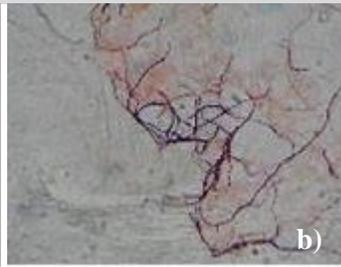
#### U-NICO-6(1)



**a)** Morfología macroscópica; colonias irregulares, planas con borde elevado, superficie rugosa, de color beige mate y consistencia suave.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos delgados, largos, Gram positivos.

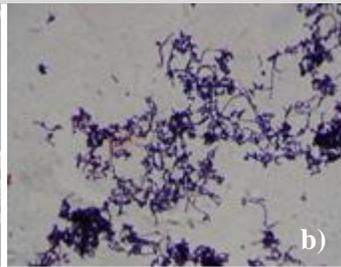
**U-NICO-6(2)**



**a)** Morfología macroscópica; colonias de aspecto crateriforme irregular, elevadas, rugosas, de color beige mate, de consistencia dura.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos Gram positivos, largos y delgados.

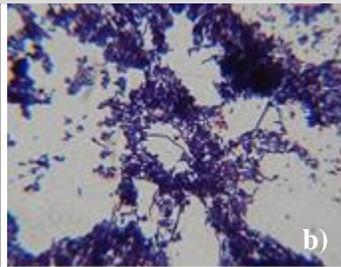
**U-NICO-7**



**a)** Morfología macroscópica; colonias pequeñas, convexas, de borde entero, color naranja mate, consistencia butirosa.

**b)** Tinción de Gram 100X; bacilos pleomorfos, Gram positivos.

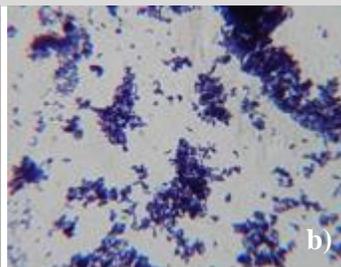
**U-NICO-8**



**a)** Morfología macroscópica; colonias esféricas, aglomeradas, color naranja mate, de consistencia butirosa.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos cortos que se fragmentan, Gram positivos.

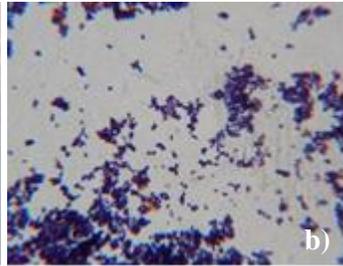
**U-NICO-10**



**a)** Morfología macroscópica; colonias irregulares, rugosas, convexas, consistencia butirosa, color salmón.

**b)** Tinción de Gram 100X; bacilos pleomorfos, resultado de la fragmentación Gram positivos.

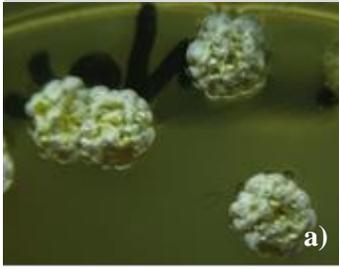
**U-NICO-10A**



**a)** Morfología macroscópica; colonias pequeñas, convexas de borde entero, color naranja mate, de consistencia cremosa.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos cortos que fragmentan en bacilos pleomorfos, Gram positivos.

#### U-NICO-11



**a)** Morfología macroscópica; colonias irregulares, rugosas, elevadas, de consistencia friable, de color beige que se el tiempo se vuelven blancas.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos, largos, ramificados, Gram positivos.

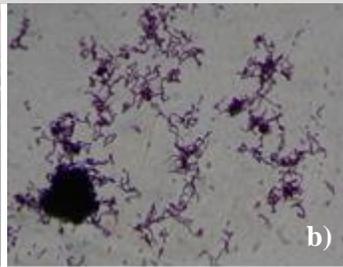
#### U-NICO-12



**a)** Morfología macroscópica; colonias, rugosas, convexas, de consistencia rígida, de color beige mate.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos, delgados, largos, con ramificaciones laterales, Gram positivos.

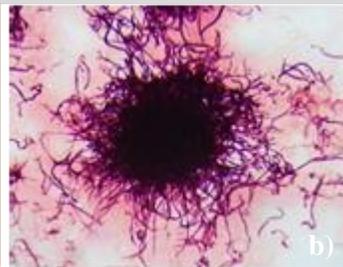
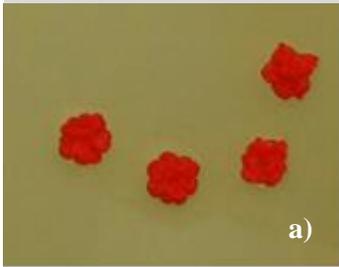
#### U-NICO-13A



**a)** Morfología macroscópica; colonias pequeñas esféricas, de color salmón mate, de consistencia butirosa.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos delgados que fragmentan en bacilos cortos, Gram positivos.

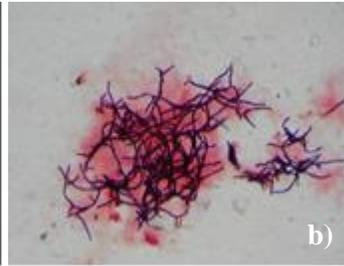
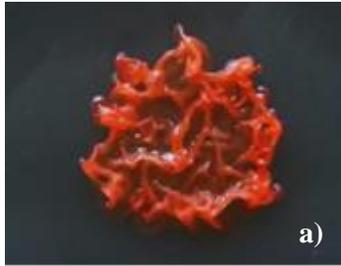
#### U-NICO-15



**a)** Morfología macroscópica; colonias crateriformes, irregulares, de color rojo brillante, consistencia rígida.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos delgados, largos, con ramificaciones, aglomerados, Gram positivos.

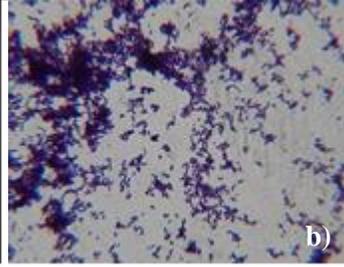
#### U-NICO-22



**a)** Morfología macroscópica; colonias irregulares, rugosas, de tamaño variable, de color rojo brillante y consistencia dura.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos delgados, ramificados, Gram positivos.

**U-NICO-23**



**a)** Morfología macroscópica; colonias irregulares, elevadas, rugosas, color naranja, de consistencia butirosa.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos cortos que fragmentan en cocobacilos, Gram positivos.

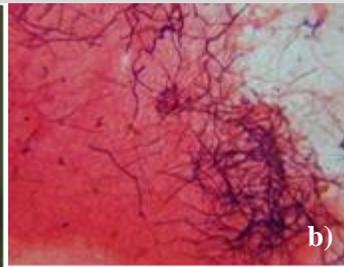
**U-NICO-24**



**a)** Morfología macroscópica; colonias irregulares, rugosas, elevadas, tamaño variable, rígidas, con el paso del tiempo se pone blanca.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos Gram positivos, largos con ramificaciones.

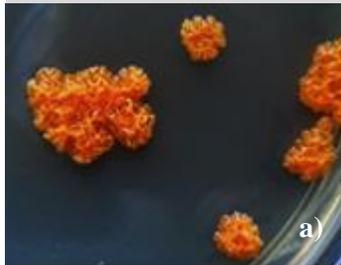
**U-NICO-26B**



**a)** Morfología macroscópica; colonias circulares convexas, blancas aterciopeladas de borde entero regular, de consistencia dura.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos, largos, delgados, Gram positivos.

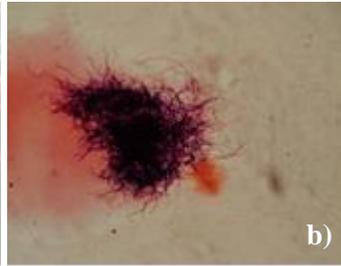
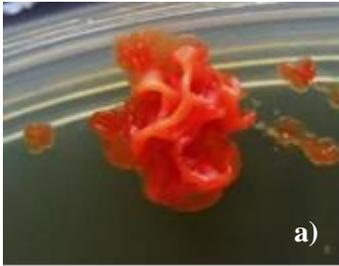
**U-NICO-26R1**



**a)** Morfología macroscópica; colonias rugosas irregulares, consistencia friable, de color naranja.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos largos, delgados con pequeñas ramificaciones, Gram positivos.

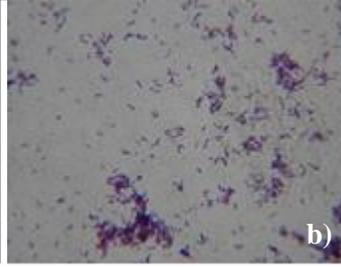
**U-NICO-26R2**



**a)** Morfología macroscópica; colonias medianas, irregulares, elevadas, rugosas, de color rojo claro mate, de consistencia friable.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos delgados, largos, aglomerados, Gram positivos.

**U-NICO-28**



**a)** Morfología macroscópica; colonias convexas, de color salmón pálido, consistencia butirosa.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos cortos que fragmentan en bacilos, Gram positivos.

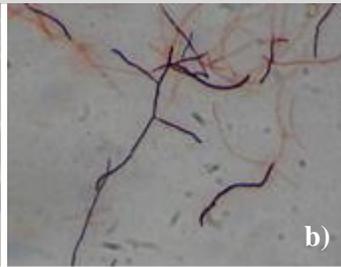
**U-NICO-30(1)**



**a)** Morfología macroscópica; colonias rugosas, convexas, color beige, de consistencia friable.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos delgados, largos, ramificados, Gram-positivos.

**U-NICO-30(2)**



**a)** Morfología macroscópica; colonias irregulares, convexas, rugosas, consistencia dura, color beige, que cambia a blanco con el tiempo.

**b)** Tinción de Gram 100x; filamentos Gram positivos, largos y delgados.

**U-NICO-30(3)**



**a)** Morfología macroscópica; colonias irregulares, crateriformes, de tamaño variable, de color beige con el paso del tiempo cambia a blanco.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos delgados, muy largos, Gram positivos.

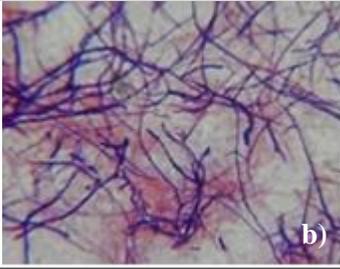
**U-NICO-30(4)**



**a)** Morfología macroscópica; colonias circulares, convexas, color blanco grisáceo, aterciopeladas, friables.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos Gram positivos, largos, curvos, delgados.

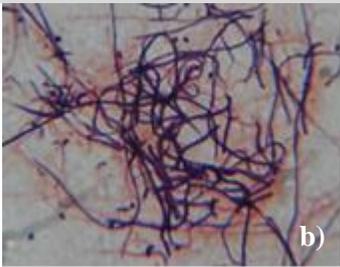
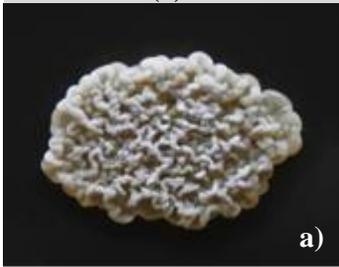
**U-NICO-30(5)**



**a)** Morfología macroscópica; colonias pequeñas, rugosas, color beige que con el tiempo se vuelven blancas, de consistencia suave.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos largos, delgados, Gram positivos.

**U-NICO-30(8)**



**a)** Morfología macroscópica; colonias irregulares, rugosas, acuminadas, friables, de color beige que cambia a blanco con aspecto pulverulento.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos, delgados, largos, Gram-positivos.

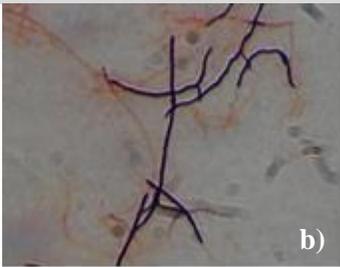
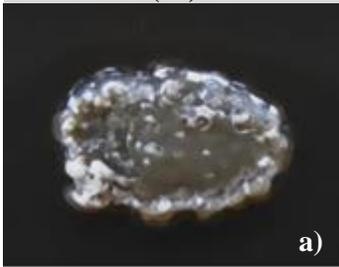
**U-NICO-30(9)**



**a)** Morfología macroscópica; colonias irregulares, convexas, rugosas, blancas pulverulentas, friables.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos, largos, curvos, delgados, Gram-positivos.

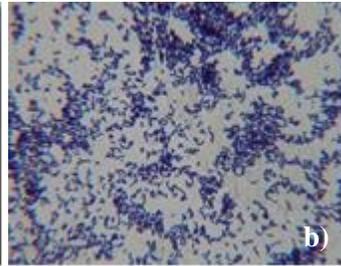
**U-NICO-30(10)**



**a)** Morfología macroscópica; colonias, pequeñas, pulverulentas, color beige-blanco, de consistencia suave.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos medianos, delgados, con presencia de ramificaciones, Gram positivos.

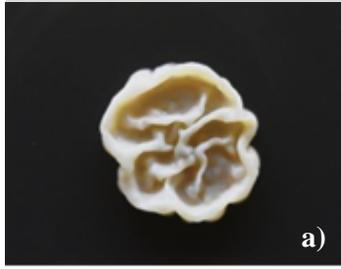
**U-NICO-31**



**a)** Morfología macroscópica; colonias pequeñas, que forman pequeñas esferas, color salmón claro, consistencia butirosa.

**b)** Tinción de Gram 100X; bacilos cortos, Gram positivos, que presentan pleomorfismo.

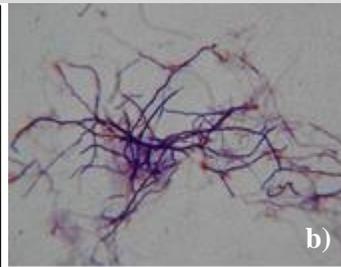
#### U-NICO-33



**a)** Morfología macroscópica; colonias medianas, blancas, rugosas, convexas, friables, aterciopeladas.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos Gram-positivos, largos que se fragmentan en filamentos más cortos.

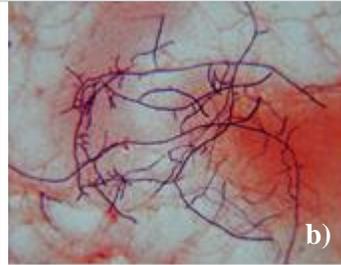
#### U-NICO-34(1)



**a)** Morfología macroscópica; colonias grandes de aspecto crateriforme, lisas, color beige, y consistencia dura.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos, delgados, largos, aglomerados, Gram positivos.

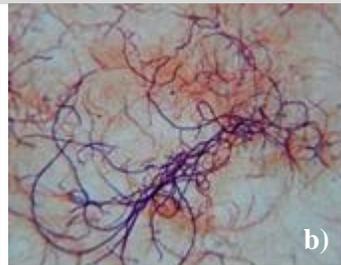
#### U-NICO-34(2)



**a)** Morfología macroscópica; colonias medianas crateriformes, color beige, borde irregular, consistencia dura.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos largos, delgados, ramificados, Gram positivos.

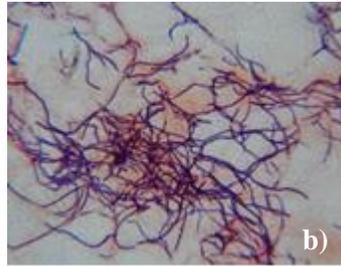
#### U-NICO-35(1)



**a)** Morfología macroscópica; colonias grandes, crateriformes, con bordes irregulares, de color gris verdoso, consistencia dura.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos, delgados, largos, Gram positivos.

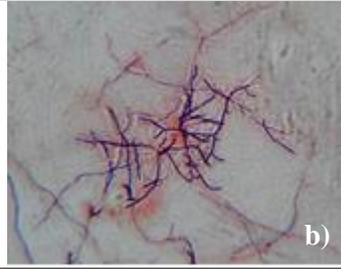
#### U-NICO-35(2)



**a)** Morfología macroscópica; colonias umbilicadas, rugosas, de borde entero, de color beige mate, de consistencia dura.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos Gram positivos, largos, aglomerados.

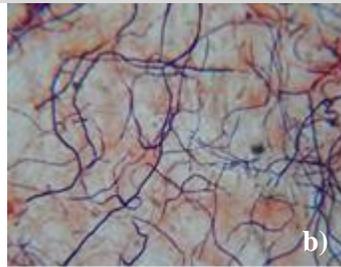
#### U-NICO-37



**a)** Morfología macroscópica; colonias grandes, radiadas, color beige, de consistencia rígida.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos, delgados, ramificados, Gram positivos.

#### U-NICO-38



**a)** Morfología macroscópica; colonias grandes, radiadas, rugosas, con bordes irregulares, consistencia dura, color beige translucido.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos, delgados, largos, Gram positivos.

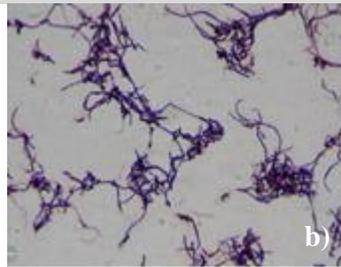
#### U-NICO-39



**a)** Morfología macroscópica; colonias grandes, de aspecto crateriforme radiado, con borde irregular, de consistencia dura, y color beige.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos largos, delgados, Gram positivos.

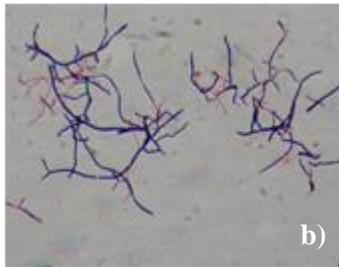
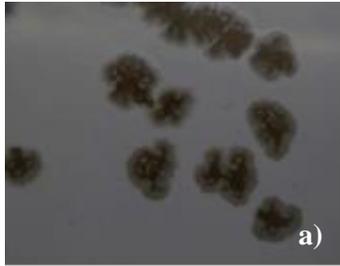
#### U-NICO-40



**a)** Morfología macroscópica; colonias rugosas, convexas, de consistencia butirosa, de color beige.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos de tamaño medio, Gram positivos, los cuales presentan ramificaciones.

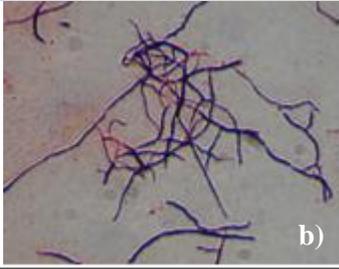
#### U-NICO-41(1)



**a)** Morfología macroscópica; colonias irregulares, rugosas, de color beige, translúcidas, consistencia suave.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos medianos, delgados, con presencia de ramificaciones, Gram positivos.

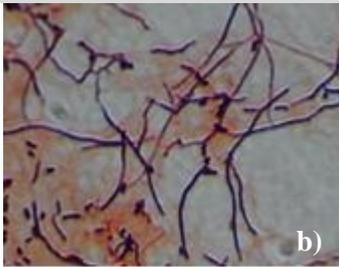
#### U-NICO-41(2)



**a)** Morfología macroscópica; colonias crateriformes, color beige brillante, borde entero.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos delgados, largos Gram positivos.

#### U-NICO-42



**a)** Morfología macroscópica; colonias irregulares, rugosas, convexas, color beige mate, consistencia suave.

**b)** Tinción de Gram 100X; filamentos medianos, delgados, con presencia de ramificaciones, Gram positivos.

Fotos originales; Fernando Villalón Jiménez

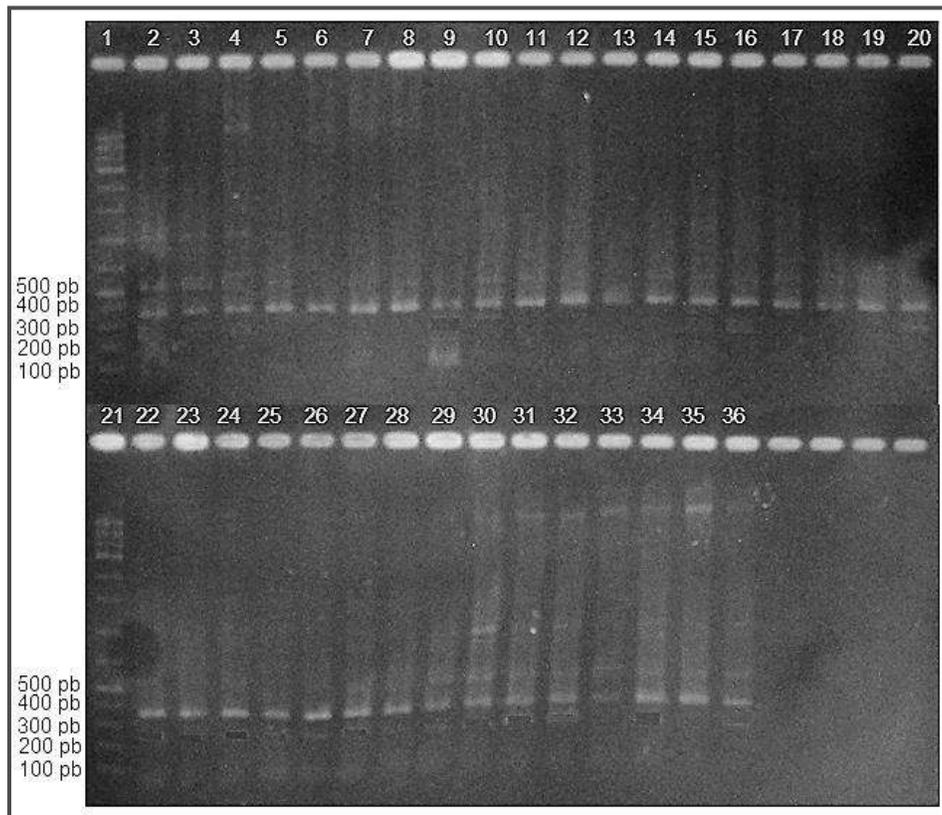
Las cepas aisladas se utilizaron en un trabajo previo llamado: *Biodiversidad fenotípica de actinomicetos aislados de sedimento de Ichaqueo, Michoacán* (Calderón, 2013), donde a cada una de las cepas aisladas se les realizó una serie de 50 pruebas bioquímicas (Tabla 8), para con esto hacer una pre-identificación fenotípica de acuerdo al metabolismo que presentan, sin embargo debido al reducido número de pruebas realizadas no fue posible realizar una pre-clasificación adecuada de géneros, por lo cual se hizo uso de técnicas de biología molecular como lo es la amplificación del marcador filogenético de bacterias de alto G+C presente en el gen 23S rRNA, para de esta forma comprobar que los aislados corresponde a dicho grupo de microorganismos, así como la secuenciación del gen 16S rRNA, el cual es utilizado para identificar géneros y especies bacterianas mediante la comparación de secuencias. Todo esto ya que algunas bacterias como las correspondientes a la familia *Thermoactinomycetaceae* (que en realidad pertenece a la familia *Bacillaceae*),



U-NICO-2  
 U-NICO6(1)  
 U-NICO-6(2)  
 U-NICO-7  
 U-NICO-8  
 U-NICO-10  
 U-NICO-10A  
 U-NICO-11  
 U-NICO-12  
 U-NICO-13A  
 U-NICO-15  
 U-NICO-22  
 U-NICO-23  
 U-NICO-24  
 U-NICO-26B  
 U-NICO-26R1  
 U-NICO-26R2  
 U-NICO-28  
 U-NICO-30(1)  
 U-NICO-30(2)  
 U-NICO-30(3)  
 U-NICO-30(4)  
 U-NICO-30(5)  
 U-NICO-30(8)  
 U-NICO30(9)  
 U-NICO-30(10)  
 U-NICO-31  
 U-NICO33  
 U-NICO-34(1)  
 U-NICO34(2)  
 U-NICO-35(1)  
 U-NICO-35(2)  
 U-NICO-37  
 U-NICO-38  
 U-NICO-39  
 U-NICO-40  
 U-NICO-41(1)  
 U-NICO-41(2)  
 U-NICO-42

### 13.3. Amplificación del marcador filogenético de bacterias de alto G+C

Debido a que la morfología macroscópica y microscópica no es suficiente para la identificación de actinomicetos, se realizó la amplificación del marcador filogenético de bacterias Gram positivas de alto G+C presente en el gen 23S rRNA, a 34 de las 39 cepas aisladas. En la Imagen 9 se muestra la electroforesis de la amplificación del inserto del gen 23S rRNA de 350 pb.



**Imagen 9.** Electroforesis de la amplificación del marcador filogenético presente en el gen 23S rRNA.

1. Marcador 1kb	10. U-NICO-12	19. U-NICO-30(1)	28. U-NICO-33
2. U-NICO-2	11. U-NICO-13A	20. U-NICO-30(3)	29. U-NICO-34(1)
3. U-NICO-6(1)	12. U-NICO-15	21. Marcador 1 kb	30. U-NICO-34(2)
4. U-NICO-6(2)	13. U-NICO-23	22. U-NICO-30(4)	31. U-NICO-35(1)
5. U-NICO-7	14. U-NICO-24	23. U-NICO-30(5)	32. U-NICO-35(2)
6. U-NICO-8	15. U-NICO-26B	24. U-NICO-30(8)	33. U-NICO-37
7. U-NICO-10	16. U-NICO-26R1	25. U-NICO-30(9)	34. U-NICO-38
8. U-NICO-10A	17. U-NICO-26R2	26. U-NICO-30(10)	35. U-NICO-39
9. U-NICO-11	18. U-NICO-28	27. U-NICO-31	36. U-NICO-42

En la electroforesis (Imagen 9) se muestra la amplificación del inserto de 100 pb adicionales que presentan las bacterias de alto G+C con respecto a las bacterias de bajo G+C, y el cual fue considerado como un marcador filogenético para las bacterias de alto G+C, producto del estudio; *Gram-positive bacteria with a high DNA G+C content are characterized by a common insertion within their 23S rRNA genes*, realizado por; Roller y col. en 1992, estudio que demostró que las bacterias Gram positivas de alto G+C presentan un inserto de 100 pb localizados entre las hélices 54 y 55 del dominio III de la región variable del gen 23S rRNA, por lo cual es observable en 350 pb para los actinomicetos y en 250 pb para las bacterias de bajo G+C debido a que no presentan este marcador.

En la (Tabla 9) se presentan los resultados de la amplificación del marcador filogenético de bacterias Gram positivas de alto G+C, donde se observa que las 34 cepas a las cuales se les amplificó este marcador filogenético lo presentaron por lo cual corresponden al orden de los actinomicetales.

**Tabla 9.** Resultados de la amplificación del inserto del gen 23S rRNA.

Cepa	Inserto 23S rRNA	Cepa	Inserto 23S rRNA	Cepa	Inserto 23S rRNA
U-NICO-2	Presente	U-NICO-24	Presente	U-NICO-31	Presente
U-NICO-6(1)	Presente	U-NICO-26B	Presente	U-NICO-33	Presente
U-NICO-6(2)	Presente	U-NICO-26R1	Presente	U-NICO-34(1)	Presente
U-NICO-7	Presente	U-NICO-26R2	Presente	U-NICO-34(2)	Presente
U-NICO-8	Presente	U-NICO-28	Presente	U-NICO-35(1)	Presente
U-NICO-10	Presente	U-NICO-30(1)	Presente	U-NICO-35(2)	Presente
U-NICO-10A	Presente	U-NICO-30(2)	ND	U-NICO-37	Presente
U-NICO-11	Presente	U-NICO-30(3)	Presente	U-NICO-38	Presente
U-NICO-12	Presente	U-NICO-30(4)	Presente	U-NICO-39	Presente

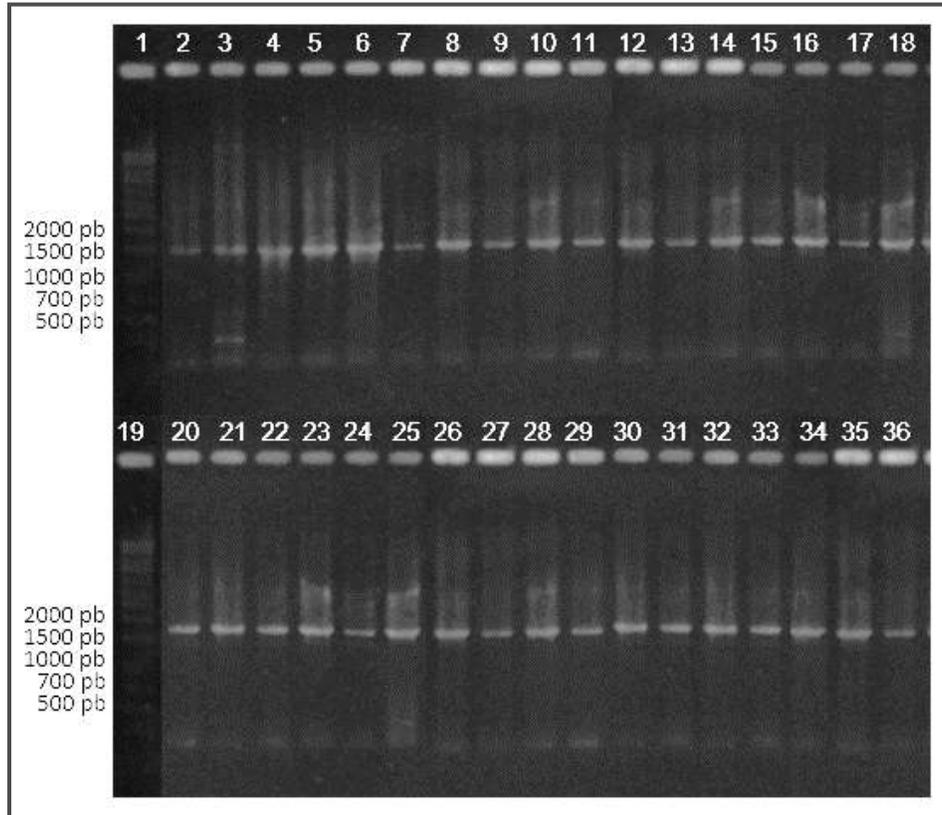
U-NICO-13A	Presente	U-NICO-30(5)	Presente	U-NICO-40	ND
U-NICO-15	Presente	U-NICO-30(8)	Presente	U-NICO-41(1)	ND
U-NICO-22	ND	U-NICO-30(9)	Presente	U-NICO-41(2)	ND
U-NICO-23	Presente	U-NICO-30(10)	Presente	U-NICO-42	Presente

ND (No Determinado)

#### 13.4. Amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA

A las 34 cepas que presentaron el marcador filogenético característico de los actinomicetos se les amplificó mediante PCR el gen 16S rRNA. Ya que como menciona Perea en 2004; el análisis del gen 16S rRNA se ha utilizado ampliamente en la clasificación e identificación bacteriana, debido a que ningún otro cronómetro molecular ha logrado desplazarlo por la serie de características que posee y son mencionadas por; Patel en 2001.

En la electroforesis (Imagen 10), se muestran la amplificación del gen 16S rRNA, donde el amplicon producto de la PCR se observa en 1500 pb, y después de comprobar la amplificación del gen 16S rRNA mediante una electroforesis (Imagen 10), se purificaron los productos mediante; Amicon Ultra filter y posteriormente fueron enviados al servicio de secuenciación de MacroGen-Maryland, USA, ya que como menciona; Herrera, URL:15, en; *Filogenia bacteriana mediante el análisis del rRNA 16S*; la secuenciación del 16S rRNA es el método de elección para determinar las relaciones taxonómicas, debido a que el 16S rRNA contiene regiones altamente conservadas y es posible encontrar regiones de 20 a 30 bases que son exclusivas de una solo especie bacteriana y una vez obtenidas las secuencias se alinearon con el programa BioEdit, para realizar la comparación de secuencias, con las secuencias de cepas que se encuentran depositadas en el Gen Bank.

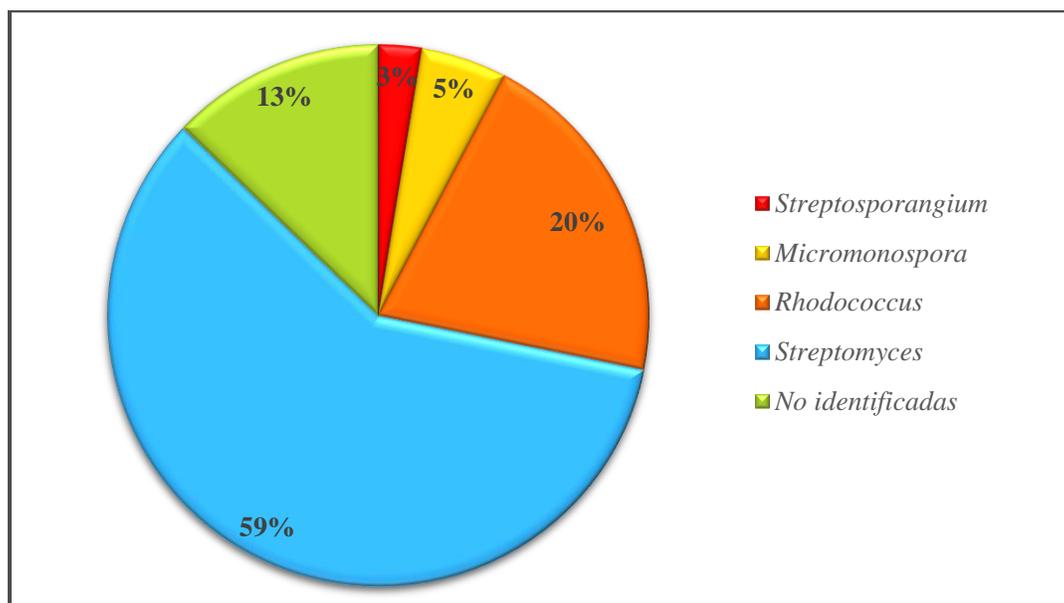


**Imagen 10.** Electroforesis de la amplificación del gen 16S rRNA.

- |                         |                 |                          |                  |
|-------------------------|-----------------|--------------------------|------------------|
| 1. Marcador Axygen 1 kb | 10. U-NICO-12   | 19. Marcador Axygen 1 kb | 28. U-NICO-33    |
| 2. U-NICO-2             | 11. U-NICO-13A  | 20. U-NICO-30(1)         | 29. U-NICO-34(1) |
| 3. U-NICO-6(1)          | 12. U-NICO-15   | 21. U-NICO-30(3)         | 30. U-NICO-34(2) |
| 4. U-NICO-6(2)          | 13. U-NICO-23   | 22. U-NICO-30(4)         | 31. U-NICO-35(1) |
| 5. U-NICO-7             | 14. U-NICO-24   | 23. U-NICO-30(5)         | 32. U-NICO-35(2) |
| 6. U-NICO-8             | 15. U-NICO-26B  | 24. U-NICO-30(8)         | 33. U-NICO-37    |
| 7. U-NICO-10            | 16. U-NICO-26R1 | 25. U-NICO-30(9)         | 34. U-NICO-38    |
| 8. U-NICO-10A           | 17. U-NICO-26R2 | 26. U-NICO-30(10)        | 35. U-NICO-39    |
| 9. U-NICO-11            | 18. U-NICO-28   | 27. U-NICO-31            | 36. U-NICO-42    |

### 13.5. Identificación de los Actinomicetos

La identificación se realizó mediante la comparación de las secuencias obtenidas con secuencias tipo que se encuentran en diferentes bases de datos como; National Center for Biotechnology Information (NCBI), EzTaxon, Ribosomal Database Project (RPD) y Bio Informatic Bacteria Identification (leBIBI), donde se identificaron 4 géneros; *Streptosporangium*, *Micromonospora*, *Rhodococcus* y *Streptomyces* (Imagen 11).



**Imagen 11.** Géneros de actinomicetos identificados en Ichaqueo.

Se identificarán 4 géneros; *Streptosporangium* (1), *Micromonospora* (2), *Rhodococcus* (8), *Streptomyces* (23) y 5 no fueron identificadas debido a que dejaron de crecer.

Dentro de los 4 géneros aislados se identificarán las siguientes especies (Tabla 10); *Streptosporangium anatoliense* (1 cepa), *Micromonospora chokoriensis* (2 cepas), *Rhodococcus coprophilus* (7 cepas), *Rhodococcus maanshaensis* (1 cepa), *Streptomyces hygrosopicus subsp. decoyicus* (1 cepa), *Streptomyces brevispora* (2 cepas), *Streptomyces sioyaensis* (1 cepa), *Streptomyces ramulosus* (1 cepa), *Streptomyces sanglieri* (1 cepa), *Streptomyces cinereorectus* (7 cepas), y 10 cepas coinciden con tres especies; *Streptomyces diastaticus subsp. diastaticus*, *Streptomyces rutgersensis* y *Streptomyces gougerotii* (Tabla 11), las cuales presentan la misma secuencia, sin embargo presenta distintos nombres.

**Tabla 10.** Identificación de los actinomicetos aislados de Ichaqueo

ID Laboratorio	ID Macrogen	Tamaño del fragmento de secuencia	Identificación	% semejanza EzTaxon	Descrito por:
U-NICO-2	FV1	1355	<i>Streptomyces hygroscopicus subsp. decoyicus</i>	99.261	Kumar & Goodfellow 2012
U-NICO-6(1)	FJ1	1331	<i>Streptomyces brevispora</i>	99.550	Zucchi y col. 2012
U-NICO-6(2)	FJ2	1351	<i>Streptomyces brevispora</i>	99.480	Zucchi y col. 2012
U-NICO-7	FJ3	1333	<i>Rhodococcus coprophilus</i>	99.770	Rowbotham & Cross 1979
U-NICO-8	FJ4	949	<i>Rhodococcus coprophilus</i>	98.090	Rowbotham & Cross 1979
U-NICO-10	FV4	1331	<i>Rhodococcus coprophilus</i>	99.624	Rowbotham & Cross 1979
U-NICO-10A	FJ5	1292	<i>Rhodococcus coprophilus</i>	99.850	Rowbotham & Cross 1979
U-NICO-11	FV6	1326	<i>Streptomyces sioyaensis</i>	99.700	Nishimura y col. 1961
U-NICO-12	FV7	1344	<i>Streptomyces ramulosus</i>	99.700	Ettlinger y col. 1958
U-NICO-13A	FJ6	989	<i>Rhodococcus coprophilus</i>	98.310	Rowbotham & Cross 1979
U-NICO-15	FV8	1332	<i>Streptosporangium anatoliense</i>	99.700	Sazak y col., 2012
U-NICO-22	-----	-----	-----	-----	-----
U-NICO-23A	FJ7	1325	<i>Rhodococcus coprophilus</i>	99.240	Rowbotham & Cross 1979
U-NICO-24	FV10	1346	<i>Streptomyces diastaticus subsp. diastaticus</i> , <i>Streptomyces rutgersensis</i> , <i>Streptomyces gougerotii</i>	100 100 100	Waksman & Henrici 1948 Waksman & Henrici 1948 Waksman & Henrici 1948
U-NICO-26B	FJ8	1374	<i>Streptomyces diastaticus subsp. diastaticus</i> , <i>Streptomyces rutgersensis</i> , <i>Streptomyces gougerotii</i>	100 100 100	Waksman & Henrici 1948
U-NICO-26R1	FV11	1309	<i>Micromonospora chokoriensis</i>	99.390	Ara & Kudo 2007
U-NICO-26R2	FV12	1335	<i>Micromonospora chokoriensis</i>	99.550	Ara & Kudo 2007
U-NICO-28	FJ9	1335	<i>Rhodococcus coprophilus</i>	95.870	Rowbotham & Cross 1979
U-NICO-30(1)	FV13	1343	<i>Streptomyces diastaticus subsp. diastaticus</i> , <i>Streptomyces rutgersensis</i> , <i>Streptomyces gougerotii</i>	100 100 100	Waksman & Henrici 1948
U-NICO-30(2)	-----	-----	-----	-----	-----
U-NICO-30(3)	FV14	1333	<i>Streptomyces diastaticus subsp. diastaticus</i> , <i>Streptomyces rutgersensis</i> , <i>Streptomyces gougerotii</i>	100 100 100	Waksman & Henrici 1948

U-NICO-30(4)	FJ10	1265	<i>Streptomyces diastaticus</i> subsp. <i>diastaticus</i> ,	99.920	Waksman & Henrici 1948
			<i>Streptomyces rutgersensis</i> ,	99.920	
			<i>Streptomyces gougerotii</i>	99.920	
U-NICO-30(5)	FV15	1347	<i>Streptomyces diastaticus</i> subsp. <i>diastaticus</i> ,	100	Waksman & Henrici 1948
			<i>Streptomyces rutgersensis</i> ,	100	
			<i>Streptomyces gougerotii</i>	100	
U-NICO-30(8)	FV16	1337	<i>Streptomyces diastaticus</i> subsp. <i>diastaticus</i> ,	100	Waksman & Henrici 1948
			<i>Streptomyces rutgersensis</i> ,	100	
			<i>Streptomyces gougerotii</i>	100	
U-NICO-30(9)	FJ11	1341	<i>Streptomyces diastaticus</i> subsp. <i>diastaticus</i> ,	98.780	Waksman & Henrici 1948
			<i>Streptomyces rutgersensis</i> ,	98.780	
			<i>Streptomyces gougerotii</i>	98.780	
U-NICO-30(10)	FJ12	1335	<i>Streptomyces diastaticus</i> subsp. <i>diastaticus</i> ,	99.000	Waksman & Henrici 1948
			<i>Streptomyces rutgersensis</i> ,		
			<i>Streptomyces gougerotii</i>		
U-NICO-31	FJ13	1299	<i>Rhodococcus maanshaensis</i>	99.000	Zhang y col. 2002
U-NICO-33	FJ14	1315	<i>Streptomyces diastaticus</i> subsp. <i>diastaticus</i> ,	99.700	Waksman & Henrici 1948
			<i>Streptomyces rutgersensis</i> ,	99.700	
			<i>Streptomyces gougerotii</i>	99.700	
U-NICO-34(1)	FJ15	1333	<i>Streptomyces cinereorectus</i>	99.620	Terekhova & Preobrazhenskaya 1986
U-NICO-34(2)	FV18	1352	<i>Streptomyces cinereorectus</i>	99.930	Terekhova & Preobrazhenskaya 1986
U-NICO-35(1)	FJ16	1332	<i>Streptomyces cinereorectus</i>	98.750	Terekhova & Preobrazhenskaya 1986
U-NICO-35(2)	FJ17	1354	<i>Streptomyces cinereorectus</i>	88.040	Terekhova & Preobrazhenskaya 1986
U-NICO-37	FJ18	1338	<i>Streptomyces cinereorectus</i>	99.630	Terekhova & Preobrazhenskaya 1986
U-NICO-38	FV20	1343	<i>Streptomyces cinereorectus</i>	100	Terekhova & Preobrazhenskaya 1986
U-NICO-39	FJ19	1362	<i>Streptomyces cinereorectus</i>	99.340	Terekhova & Preobrazhenskaya 1986
U-NICO-40	----	----	----	----	----
U-NICO-41(1)	----	----	----	----	----
U-NICO-41(2)	----	----	----	----	----
U-NICO-42	FV22	1341	<i>Streptomyces sanglieri</i>	99.851	Terekhova & Preobrazhenskaya 1986

La identificación de los géneros de actinomicetos presentes en el sedimento de la cascada “Chorro Prieto”, Ichaqueo, Michoacán, coincide con los reportados en diversos estudios en diferentes países como: India por: Ningthoujam y col. en 2011, China por: Jiang & Xu en 1989; y Egipto por: Rifaat en 2003, donde los principales géneros aislados son: *Streptomyces*, y *Micromonospora*, entre otros.

Los reportes nacionales principalmente se centran de actinomicetos aislados de ambientes salinos donde los principales géneros reportados son; *Streptomyces*, *Micromonospora* y *Rhodococcus* por: Becerril-Espinosa y col. en 2012, en el Golfo de California y por: Maldonado y col. en 2008, en el Golfo de México, géneros que coinciden con los que se identificarán en Ichaqueo, Michoacán.

En la Tabla 11, se muestran las cepas que fueron identificadas con tres especies correspondientes al género *Streptomyces*.

**Tabla 11.** Cepas identificadas con tres especies del género *Streptomyces*.

ID Laboratorio	ID BLAST	ID EzTaxon	ID RDP	ID leBIBI
U-NICO-24	<i>S. diastaticus</i> <i>S. gougerotii</i> <i>S. rutgersensis</i>	<i>S. rutgersensis</i> <i>S. diastaticus</i> <i>S. gougerotii</i>	<i>S. rutgersensis</i> <i>S. gougerotii</i> <i>S. diastaticus</i>	<i>S. rutgersensis</i> <i>S. gougerotii</i> <i>S. diastaticus</i>
U-NICO-26B				
U-NICO-30(1)				
U-NICO-30(3)				
U-NICO-30(4)				
U-NICO-30(5)				
U-NICO-30(8)				
U-NICO-30(9)				
U-NICO-30(10)				
U-NICO-33				

10 de las cepas aisladas fueron identificadas con tres especies del género *Streptomyces* con el mismo porcentaje de similitud, donde las tres cepas tipo presentan la misma secuencia de nucleotidos.

Por lo cual para hacer una identificación mas puntal de ciertas especies del género *Streptomyces* es necesario hacer uso de otras técnicas moleculares como; la identificación de los sistemas *NRPS/PKS* (Polipeptidos Sintetaza no Ribosomal/Poliquetido Sintasa), los

cuales son poliétidos multifuncionales sintetizados por grupos de genes codificados para un número variable de módulos con múltiples actividades enzimáticas, sin embargo estos sistemas no son exclusivos de los actinomicetos y gran cantidad de bacterias presentan estos sistemas de acuerdo a los descritos por; Amoutzias y col. en 2008.

También se pueden utilizar la comparación de otras secuencias de genes como lo son; el espacio intergenico 16S-23S rRNA (ITS), 23S rRNA, la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa (*rpo $\beta$* ), subunidad  $\beta$  de la DNA girasa (*gyr $\beta$* ) los cuales son mencionados por: Bou y col. en 2011: “*Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*”.

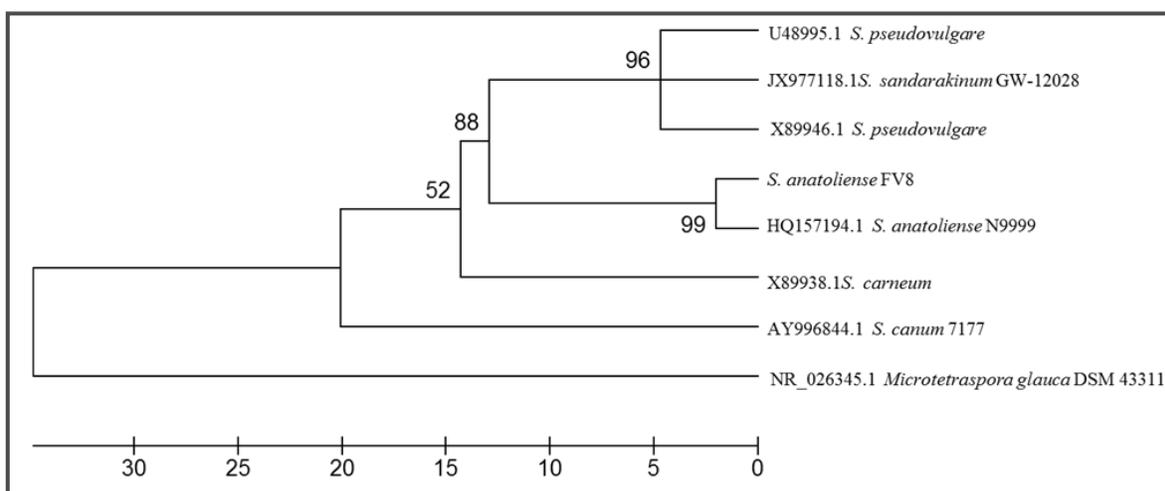
El género *Streptosporangium*, fue el género de actinomicetos que no coincide con los reportes existentes sobre actinomicetos aislados de ecosistemas acuáticos, ya que de este género no se encontró ningún reporte que indique que se ha aislado de ambientes acuáticos, ya que la especie identificada tiene poco tiempo de ser descrita y fue aislada e identificada de suelo en Turquía por: Sazak y col. en 2012.

El cual es un aporte al estudio de los microorganismos ya que nos habla de la ubicuidad de los actinomicetos, ya que se encontraron especies de actinomicetos que han sido reportadas en otros países como por ejemplo; Turquía (*S. anatoliense*), Bangladesh (*M. chokoriensis*), Alemania (*R. coprophilus*), Reino Unido (*S. brevispora*, *S. sanglieri*), USA (*S. hygrosopicus* *susbp. decoyicus*), y ahora también se conoce que forman parte de la biodiversidad microbiana de Ichaqueo, Michoacán debido al presente trabajo.

### 13.6. Análisis filogenético de los actinomicetos identificados

Posterior a la identificación de las cepas aisladas en las diferentes bases bioinformáticas, se realizó una comparación entre las secuencias identificadas, con secuencias de especies con las cuales presentaban gran similitud, para de esta forma realizar un análisis filogenético y tener una mayor confiabilidad en la identificación realizada.

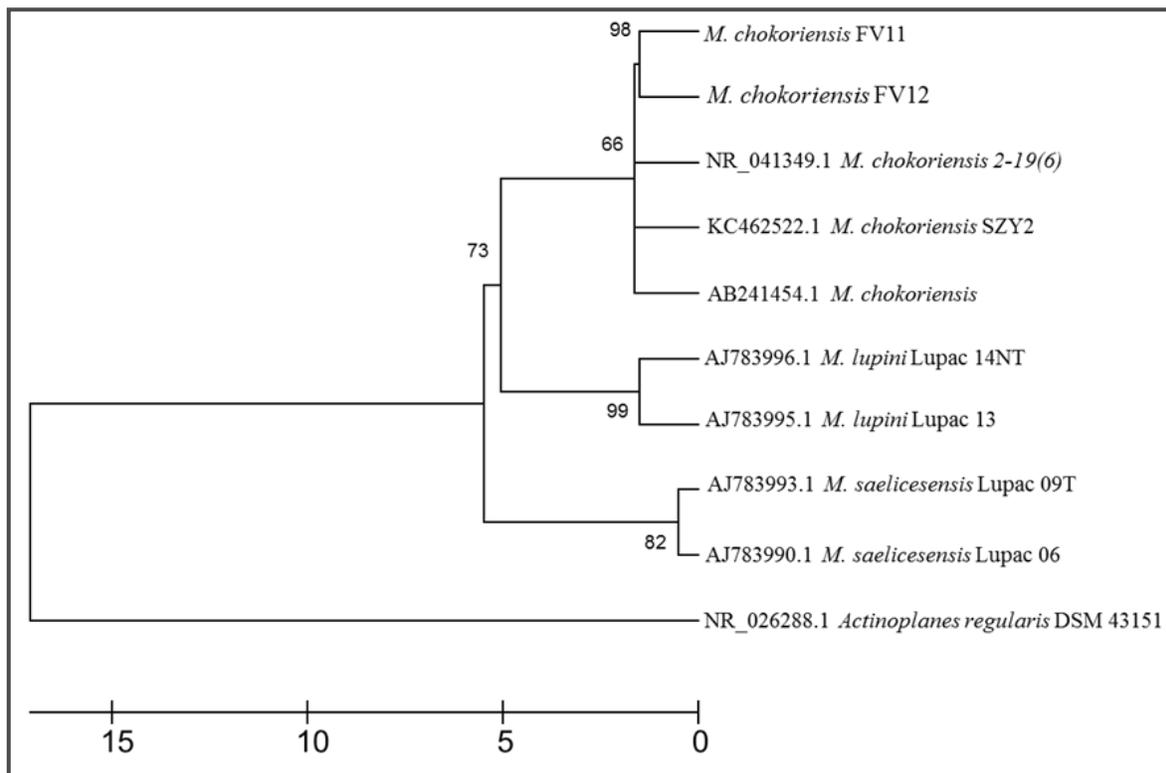
#### Análisis filogenético de los actinomicetos pertenecientes al género *Streptosporangium*



**Imagen 12.** Árbol filogenético de la cepa identificada en el género *Streptosporangium*.

Construido con el método de Máxima Parsimonia, usando la comparación de las secuencias analizadas del gen 16S rRNA, y secuencias con las que presentaban gran similitud, usando un Bootstrap de 1000 repeticiones. Utilizando *Microtetraspora glauca* para generar la raíz.

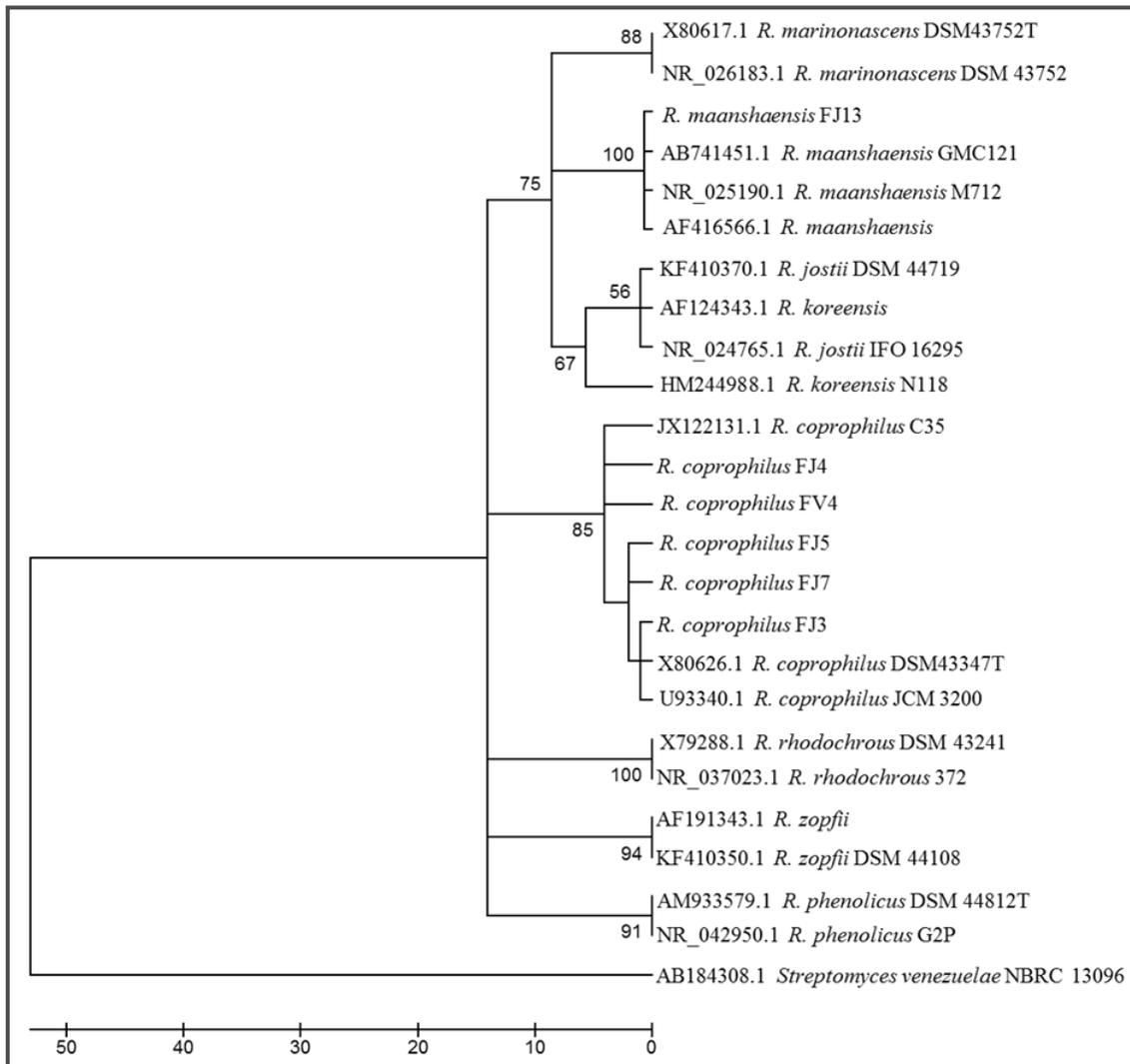
En la Imagen 12 se muestra el árbol filogenético donde se incluye la cepa FV8 (UNICO-15), la cual identificada dentro del género *Streptosporangium*, además se incluyen secuencias de especies que presentan gran similitud, como; *S. pseudovulgare* con quien presenta gran similitud, situación que se presentó cuando *S. anatoliense* fue descrito por primera vez, sin embargo los datos genotípicos y fenotípicos demostraron que debería ser considerada una especie nueva como lo describe Sazak y col. en 2012, en; *Streptosporangium anatoliense* sp. nov., isolated from soil in Turkey. Sin embargo como el análisis filogenético realizado, se comprueba que la secuencia FV8 corresponde con *S. anatoliense*, y presenta una relación ancestral con *S. pseudovulgare*.

Análisis filogenético de los actinomicetos pertenecientes al género *Micromonospora*

**Imagen 13.** Árbol filogenético de las cepas identificadas en el género *Micromonospora*.

Construido con el método de Máxima Parsimonia, usando la comparación de las secuencias analizadas del gen 16S rRNA y secuencias con las que presentaban gran similitud, usando un Bootstrap de 1000 repeticiones. Para la raíz se utilizó la secuencia *Actinoplanes regularis*.

En la Imagen 13 se muestra el árbol filogenético donde se incluyen las secuencias FV11 (U-NICO-26R1) y FV12 (U-NICO-26R2), las cuales fueron identificadas dentro del género *Micromonospora*, además se incluyeron dos secuencias con las cuales presentaban gran similitud, y finalmente después de realizar la construcción del árbol filogenético mediante el método del Máxima Parsimonia, se puede decir que FV11 y FV12 tienen gran similitud con *Micromonospora chokoriensis*, por lo cual se identifican con esta especie, ya que *M. chokoriensis* fue descrita como nueva especie a partir de hibridación de DNA-DNA, diferencias fisiológicas y bioquímicas las cuales marcaron la pequeñas diferencia filogenéticas entre; *M. mirobrigenensis* y *M. carbonacea*, cuestión que menciona, Ara & Kudo en 2007: “Two new species of the genus *Micromonospora*: *Micromonospora chokoriensis* sp. nov. and *Micromonospora coxensis* sp. nov., isolated from sandy soil”.

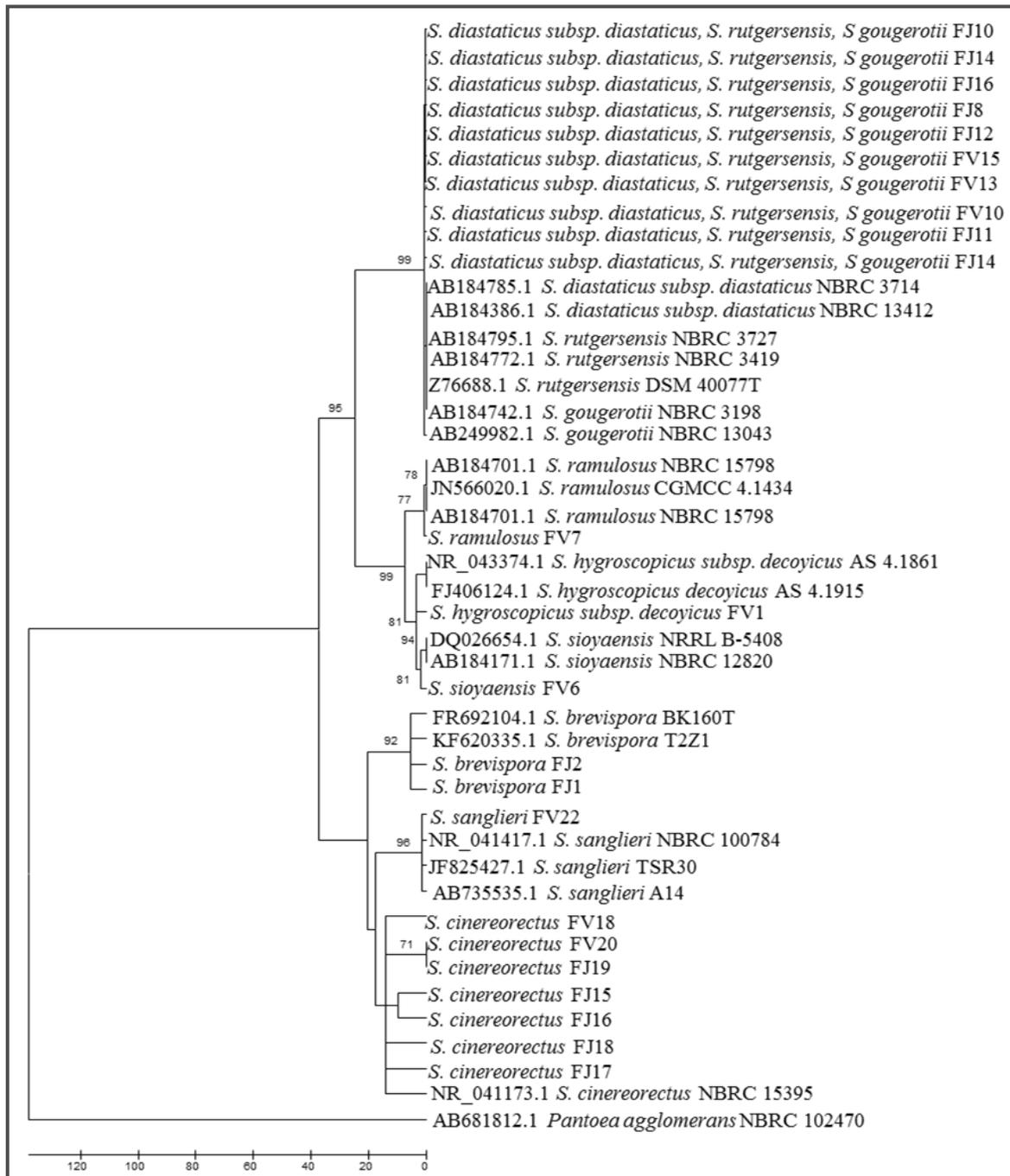
Análisis filogenético de los actinomicetos pertenecientes al género *Rhodococcus*

**Imagen 14.** Árbol filogenético de las cepas identificadas en el género *Rhodococcus*.

Construido con el método de Máxima Parsimonia, usando las secuencias analizadas del gen 16S rRNA, y secuencias con las que presentaban gran similitud, utilizando un Bootstrap de 1000 repeticiones, y haciendo uso de *Streptomyces venezuelae* para generar la raíz.

En la Imagen 14, se muestran las secuencias; FJ13 (U-NICO-7), FJ4 (U-NICO-8), FV4 (U-NICO-10), FJ5 (U-NICO-10A), FJ7 (U-NICO-23), FJ3 (U-NICO-31), las cuales fueron identificadas dentro del género *Rhodococcus*, así como secuencias con las que presentaban gran similitud, las secuencias analizadas fueron identificadas como; *R. maanshaensis*, especie aislada de suelo y descrita por: Zhang y col. en 2002, y *R. coprophilus* especie descrita por: Rowbotham & Cross en 1977.

**Análisis filogenético de los actinomicetos pertenecientes al género *Streptomyces***



**Imagen 15.** Árbol filogenético de las identificadas en el género *Streptomyces*.

Construido con el método de Máxima Parsimonia, usando la comparación de las secuencias analizadas del gen 16S rRNA, y secuencias con las que presentaban gran similitud, usando un de Bootstrap de 1000 repeticiones la raíz se construyó utilizando *Pantoea agglomerans*.

En el árbol filogenético (Imagen 15), se analizaron las secuencias; FJ10 (U-NICO-30(4)), FJ14 (U-NICO-33), FV16 (U-NICO-30(8)), FJ8 (U-NICO-26B), FJ12 (U-NICO-30(10)), FV15 (U-NICO-30(5)), FV13 (U-NICO-30(1)), FV10 (U-NICO-24), FJ11 (U-NICO-30(9)), FV14 (U-NICO-30(3)), FV7 (U-NICO-12), FV1 (U-NICO-2), FV6 (U-NICO-11), FJ2 (U-NICO-6(2)), FJ1 (U-NICO-6(1)), FV22 (U-NICO-42), FV18 (U-NICO-34(2)), FV20 (U-NICO-38), FJ19 (U-NICO-39), FJ15 (U-NICO-34(1)), FJ16 (U-NICO-35(1)), FJ18 (U-NICO-37), FJ17 (U-NICO-35(2)), las cuales fueron identificadas dentro del género *Streptomyces* y secuencias con las cuales presentaban gran homología, se comprobó que las especies identificadas se agrupan en el clúster correspondiente con valores elevados de bootstrap, siendo las especies de *S. hygroscopicus subsp. decoyicus*, *S. brevispora*, *S. ramulosus*, *S. sanglieri*, *S. sioyaensis* y *S. cinereorectus* las especies identificadas sin ningún problema.

Sin embargo como se mencionó anteriormente, 10 cepas fueron identificadas con un porcentaje de similitud mayor al 99.8% con tres especies del género *Streptomyces* (Tabla 11), las cuales al hacer el análisis filogenético presentan la misma secuencia, por lo cual no se puede hacer una separación entre estas tres especies, cuestión que coincide con lo reportado en: *Phylogenetic study of the species within the family Streptomycetaceae*, por: Labeda, y col. en 2011, el cual es un estudio sobre la vasta familia *Streptomycetaceae*, debido a los problemas existentes en la identificación de *Streptomyces*, por la gran cantidad de especies existentes y que presentan actividad biológica.

Por lo cual es necesario hacer uso de técnicas de biología molecular adicionales a la secuenciación del gen 16S rRNA, ya que como se observó algunas especies principalmente del género *Streptomyces* presentan gran homología, por lo cual es necesario tener la mayor información posible sobre este tipo de especies para de esta forma poder separarlas de acuerdo a diferencias que presenten o agruparlas en una sola especie y de esta forma reducir los problemas en la nomenclatura actual y poder tener una mayor precisión en la taxonomía de los actinomicetos.

## 14. Conclusiones

El método de dilución con el tratamiento de dodecilsulfato de sodio 1% (SDS) y extracto de levadura 3% (YE), así como la incubación a 40 °C por 20 minutos, es un buen método para el aislamiento de actinomicetos presentes en los diversos sedimentos, ya que la cantidad de cepas aisladas con morfología macroscópica y microscópica propia de dicho orden, lo cual se confirmó posteriormente. Sin embargo cabe mencionar que no fueron las únicas cepas aisladas, ya que también se aislaron otras cepas bacterianas que no representaban ningún interés para el estudio de la biodiversidad filogenética de actinomicetos, ya que no pertenecían a este grupo de microorganismos.

La amplificación del marcador filogenético para bacterias de alto contenido de Guanina-Citosina (presente en gen 23S rRNA) fue muy útil para determinar que 34 de los 39 aislados procedentes del sedimento de la cascada de “Chorro Prieto” en Ichaqueo, Michoacán, corresponden al orden de los actinomicetales, los 5 aislados faltantes no se les realizó esta amplificación debido a que dejaron de crecer repentinamente y no fue posible obtener su material genético. Debido a que este tipo de microorganismos presentan un inserto de 100 pb más que el resto de las eubacterias en el gen 23S rRNA por lo cual al momento de amplificarlo y revelar la electroforesis se pueden observar una banda en 350 pb, lo cual indica la presencia del marcador característico de las bacterias de alto contenido de G+C en el DNA (Actinomicetos).

Con la secuenciación del gen 16S rRNA se identificaron 4 géneros; *Streptosporangium*, *Micromonospora*, *Rhodococcus* y *Streptomyces*, y 11 especies; *S. anatoliense*, *M. chokoriensis*, *R. coprophilus*, *R. maanshaensis*, *S. cinereorectus*, *S. hygrosopicus subsp. decoyicus*, *S. ramulosus*, *S. sioyaensis*, *S. sanglieri*, *S. brevispora*, y 3 especies de *Streptomyces* con las cuales coinciden varias cepas; *S. diastaticus subsp. diastaticus*, *S. rutgersensis* y *S. gougerotii*. Todas estas especies correspondiendo al orden de los actinomicetales, siendo *Streptomyces*, *Micromonospora* y *Rhodococcus*, géneros aislados principalmente de diversos sedimentos en diversas partes del mundo.

Con el análisis filogenético se comprueba que las cepas aisladas corresponden a géneros de actinomicetos ya que se agrupan en los clúster correspondientes de especies y géneros. Siendo el principal y con mayor abundancia de especies el género *Streptomyces*, seguido por *Rhodococcus*, *Micromonospora* y finalmente por *Streptosporangium*, con lo cual se comprueba lo reportado en la literatura, donde se menciona que el principal género aislado corresponde al género *Streptomyces*.

Adicionalmente la colección de 34 cepas de actinomicetos, se crioconservaron a -70 °C, y dicha colección se encuentra depositada en el Laboratorio de Producción de Biológicos “George Michel” de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, en la ciudad de México, D.F. Así como también se realizó la conservación en suelo estéril modificado la cual es una forma de conservación alternativa desarrollada en el Laboratorio de Microbiología, de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Y además se debe mencionar que este es el primer trabajo que se realiza en el estado de Michoacán sobre la diversidad de actinomicetos presentes en el sedimento de un cauce natural de agua dulce en el estado, lo cual es muy importante, ya que otros países han realizado este tipo de estudios y han obtenido resultados importantes como son el hallazgos de especies de actinomicetos que tienen la capacidad de producir metabolitos bioactivos con diferentes campos de acción.

## 15. Referencias

1. Alonso, G. S. (2013). *Identificación de Actinobacterias Halófilas Productoras de Proteasas, Lipasas y Amilasas*. Universidad Autónoma del Estado de México, Laboratorio de Microbiología Médica y Ambiental, Toluca.
2. Amoutzias, G., Van de Peer, Y., & Mossialos, D. (2008). Evolution and taxonomic distribution of non-ribosomal peptide and polyketides synthases. *Future Microbiology*, 3, 361-370.
3. Ara, I., & Kudo, T. (2007). Two new species of the genus *Micromonospora*: *Micromonospora chokoriensis* sp. nov. and *Micromonospora coxensis* sp. nov., isolated from sandy soil. *Journal of General and Applied Microbiology*, 53(1), 29-37.
4. Arenas, R. (2011). Generalidades. En R. Arenas, *Micología médica ilustrada* (págs. 9-13). México D.F., México: McGrawHill.
5. Becerril-Espinosa, A., Guerra-Rivas, G., Ayala-Sánchez, N., & Soria-Mercado, I. (2012). Antitumor activity of Actinobacteria isolated in marine sediment from Todos Santos Bay, Baja California, Mexico. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 47(2), 317-325.
6. Bonifaz, A. (2012). Propiedades generales de los actinomicetos. En A. Bonifaz, *Micología médica básica* (págs. 34-39). México D.F., México: McGrawHill.
7. Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601-608.
8. Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., & Morse, S. A. (2008). Clasificación de las bacterias. En G. F. Brooks, K. C. Carroll, J. S. Butel, & S. A. Morse, *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg* (págs. 45-53). México, México: El Manual Moderno.
9. Calderón, L. (2013). *Biodiversidad fenotípica de actinomicetos aislados de sedimento de Ichaqueo, Michoacán*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Laboratorio de Microbiología, Morelia.
10. Castro Escarpulli, G., & Lugo De La Fuente, G. (2005). Taxonomía de las bacterias de interés médico. En G. Lugo De La Fuente, *Bacteriología Médica* (págs. 49-55). México: Cuéllar.
11. De la Rosa García, S., & Gamboa Angulo, M. M. (2004). Microorganismos acuáticos: una farmacia por visitar. *Ciencia Ergo Sum*, 11(2), 186-190.
12. Franco, M. (2008). *Evaluación de caracteres PGPR en Actinomicetos e Interacciones de estas Rizobacterias con Hongos Formadores de Micorrizas*. Universidad de Granada, Departamento de Fisiología Vegetal. Granada: Editorial de la Universidad de Granada.

13. Gobernado, M., & López-Hontangas, J. (2003). Identificación bacteriana. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 21(2), 54-60.
14. Hayakawa, M., & Nonomura, H. (1989). A New Method for the Intensive Isolation of Actinomycetes from Soil. *Actinomycetologica*, 3, 95-104.
15. Herrera, M. (s.f.). *Filogenia bacteriana mediante el análisis del rRNA 16S*. Tlalnepantla. Obtenido de <http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Departamentos/Samp/Microbiologia/filogenetica.pdf>
16. Hidrin, N., Goodfellow, M., Boiron, P., Moreno, M., & Serrano, J. (2001). Los estreptomicetes. Actualización y revisión didáctica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 21(1).
17. Jiang, C., & Xu, L. (1989). Studies on actinomycetes flora and resources in the plateau lakes in Yunnan. *Acta Microbiologica Sinica*, 29(1), 7-14.
18. Jiménez, E. (2005). Reacción en cadena de la polimerasa. En E. Jiménez, *Genética y Biología Molecular Aplicación de los Procesos Biológicos Fundamentales* (págs. 33-49). México D.F.: Editores de Testox Mexicanos.
19. Kokare, C., Mahadik, K., & Kadam, S. (2004). Isolation of bioactive marine actinomycetes from sediments isolated from Goa and Maharashtra coastlines (west coast of India). *Indian Journal of Marine Sciences*, 33(3), 248-256.
20. Koneman, E. W., Janda, W. M., Winn, W. C., Allen, S. D., Procop, G. W., Schreckenberger, P. C., & Woods, G. L. (2008). *Koneman Diagnóstico microbiológico Texto y Atlas en color*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
21. Labeda, D., Goodfellow, M., Brown, R., Ward, A., Lannot, B., Vanncanneyt, M., . . . Sakane, T. (2011). Phylogenetic study of the species within the family Streptomycetacea. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101(1), 73-104.
22. Leiva, S., Yáñez, M., Zaror, L., Rodríguez, H., & García-Quintana, H. (2004). Actividad antimicrobiana de actinomycetes aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. *Revista médica de Chile*, 132(2), 151-159.
23. Llorenc, V., & Ferreruela, R. (s.f.). *Nocardia asteroides*. Hospital Universitari Vall d'Hebron, Servei de Microbiologia Clínica, Barcelona. Obtenido de <http://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/nocardia.pdf>
24. Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., & Clark, D. (2009). *Brock Biología de los microorganismos*. Madrid, España: PEARSON EDUCACIÓN, S.A.
25. Madigan, M., Martinko, J., Stahl, D., & Clark, D. (2012). *Broock biology of micoorganisms*. San Francisco: Pearson.

26. Maldonado, L. A., Fragoso-Yañez, D., Pérez-García, A., Rosellón-Druker, J., & Quintana, E. T. (2008). Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek*, 95, 111-120.
27. Manfio, G., Atalan, E., Zakrzewska-Czerwinska, J., Mordaski, M., Rodríguez, C., Collins, M., & Goodfellow, M. (2003). Classification of novel soil streptomycetes as *Streptomyces aureus* sp. nov., *Streptomyces laceyi* sp. nov. and *Streptomyces sanglieri* sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 83(3), 245-255.
28. Manivasagan, P., Gnanam, S., Sivakumar, K., Thangaradjou, T., Vijayalakshmi, S., & Balasubramanian, T. (2010). Studies on Diversity of Marine Actinobacteria form Tamilnadu Part of Bay of Bengal, India. *Libyan Agriculture Research Center Journal International*, 1(6), 362-374.
29. Martínez, A., & González, A. (s.f.). *Aplicaciones de la Bioinformática en la Elaboración de Filogenias Moleculares*. Universidade da Coruña, Biología Celular y Molecular, Coruña.
30. Martínez, M. d. (2005). Actinomicetoma. En G. Lugo de la Fuente, *Bacteriología Médica* (págs. 741-752). México: Ediciones Cuéllar.
31. Medina, H. M., & Evangelista, Z. (Enero de 2011). Aislamiento y Búsqueda de Actinobacterias del suelo Productoras de Enzimas Extracelulares y Compuestos con Actividad Antimicrobiana. *UNACAR Tecnociencia*, 5(1), 72-78.
32. Mendoza-Revilla, J. (2012). Aportes de la filogenética a la investigación médica. *Revista Medica Herediana*, 23(2), 119-127.
33. Meneses, C., Rozo, L., & Franco, J. (2011). Tecnologías bioinformáticas para el análisis de secuencias de ADN. *Scntia et Technica*, 16(49), 116-121.
34. Molina, J. (2010). Clasificación y Taxonomía Bacteriana. En J. Molina, M. E. Manjarrez, & J. Tay, *Bacteriología y Virología* (págs. 69-77). México: Méndez Editores.
35. Naidenova, M., & Vladimirova, D. (2002). Isolation and Taxonomic Investigation of Actinomycetes from Specific Biotopes in Bulgaria. *Journal of Culture Collections*, 3, 15-24.
36. Ningthoujam, D., Sanasam, S., & Nimaichand, S. (2011). Studies on Bioactive Actinomycetes in a Niche Biotope, Nambul River in Manipur, India. *Microbial and Biochemical Technology*, 1-6.
37. Patel, J. B. (2001). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Pathogen Identification in the Clinical Laboratory. *Molecular Diagnosis*, 6(4), 313-321.
38. Peña, C. (2011). Métodos de inferencia filogenética. *Revista Peruana Biología*, 18(2), 265-267.

39. Perea, E. J. (2004). La flora de la boca en la era de la biología molecular. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 9, 1-10.
40. Pérez de Castro, A. M. (s.f.). *Reacción en cadena de la polimerasa*. Biotecnología. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
41. Prescott, Harley, & Klein. (2002). Microorganism Interations and Microbial Ecology. En Prescott, Harley, & Klein, *Microbiology* (págs. 596-597). The McGraw-Hill.
42. Ramírez, N., Serrano, J. A., & Sandoval, H. (2006). Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(3), 56-71.
43. Rifaat, H. (2003). The biodiversity of Actinomycetes in the River Nile exhibiting antifungal activity. *Journal of Mediterranean Ecology*, 4(3-4), 5-7.
44. Rodicio, M. d., & Mendoza, M. d. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 22(4), 238-245.
45. Rodríguez, E. A. (2012). *Conceptos básicos de filogenética molecular*. Tamaulipas.
46. Roller, C., Ludwing, W., & Heinz, K. (1992). Gram-positive bacteria with a high DNA G+C content are characterized by a common insertion within their 23S rRNA genes. *Journal of General Microbiology*, 138, 1167-1175.
47. Rowbotham, T., & Cross, T. (1977). Ecology of *Rhodococcus coprophilus* sp. nov.: an aerobic nocardioform actinomycete belonging to the "rhodochrous" complex. *Journal of General Microbiology*, 100(1), 123-138.
48. Salazar, F. (3 de Abril de 2013). *Cascadas de Ichaqueo*. Recuperado el 3 de Abril de 2013, de Cascadas de Ichaqueo: <http://ichaqueo.awardspace.com/modules.php?name=Contact>
49. Sandoval, H., Sánchez-Saucedo, N. L., Serrano, J. A., & Goodfellow, M. (2007). Reflexiones sobre el concepto de especie bacteriana. En J. A. Serrano, Á. H. Sandoval, & B. L. Beaman, *Actinomicetoma* (págs. 71-76). Mexico, D.F., México: Plaza y Valdés.
50. Sazak, A., Sahin, N., Camas, M., Guven, K., & Goodfellow, M. (2012). *Streptosporangium anatoliense* sp. nov., isolated from soil in Turkey. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 102(2), 269-276.
51. Schneeman, I., Nagel, K., Kajahn, I., Labes, A., Wiese, J., & Imhoff, J. (2010). Comprehensive Investigation of Marine Actinobacteria Associated with the Sponge *Halochondria panicea*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(11), 3702-3714.
52. Serrano, J. A., & Sandoval, H. (2005). *Identificación y diagnóstico de Actinomicetales patógenos*. Mérida: Venezolana C.A.

53. Shumin, Z., & Liang, Y. X. (2012). Diversity and Bioactivity of Actinomycetes from Marine Sediments of the Yellow Sea. *Journal of Ocean University of China (Oceanic and Coastal Sea Research)*, 11(1), 59-64.
54. Sibanda, T., Mabinya, L., Mazomba, N., Akinpelu, D., Bernard, K., Olaniran, A., & Okoh, A. (2010). Antibiotic Producing Potentials of Three Freshwater Actinomycetes Isolated from the Eastern Cape Province of South Africa. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 2612-2623.
55. Soler, A. (2012). *Biodiversidad de Actinomicetos Aislados de Plantas Depuradoras de Aguas Residuales. Estudio de la Capacidad de Biodegradación de Compuestos Tóxicos*. Universitat Politècnica de València, Biociències. València: Universitat Politècnica de València.
56. Suthindhiran, K., & Kannabiran, K. (2010). Diversity and exploration of bioactive marine actinomycetes in the Bay of Bengal of the Puducherry coast of India. *Indian Journal of Microbiology*, 50(1), 76-82.
57. Ul-Hassan, A., & Wellington, E. M. (2009). Actinobacteria. En Schaechter, *Encyclopedia of Microbiology* (págs. 22-44). San Diego, California, USA: Elsevier.
58. Vicente, J., Stewart, A., Song, B., Hill, R., & Wright, J. (2013). Biodiversity of Actinomycetes Associated with Caribbean Sponges and Their Potential for Natural Product Discovery. *Marine Biotechnology*, 15(4), 413-424.
59. Yoon, J.-H., & Park, Y. (2000). Phylogenetic analysis of the genus *Thermoactinomyces* based on 16S rDNA sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 1081-1086.
60. Zardoya, R. (2010). El árbol de la vida: la filogenia de la biodiversidad. *Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular*, 16-19. Obtenido de <http://www.sebbm.com/pdf/165/d03165.pdf>
61. Zhang, J., Zhang, Y., Xiao, C., Liu, Z., & Goodfellow, M. (2002). *Rhodococcus maanshaensis* sp. nov., a novel actinomycetes from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(6), 2121-2126.

## **16. Productividad**

**16.1. Estancia de verano durante el; XVII Verano de la Investigación Científica y Tecnológica del Pacífico (Programa Delfín), en el Laboratorio Producción de Biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.**

**16.2. Congreso Nacional del XVII Verano de la Investigación Científica y Tecnológica del Pacífico.**

- Presentación Oral

### **Aislamiento de Actinomicetos Presentes en Suelo**

Fernando Villalón. Facultad de Químico Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. fernando\_XIV\_3@hotmail.com Asesor D.C. Horacio Sandoval. Laboratorio Producción de Biológicos, Universidad Autónoma de México-Xochimilco. hsandov@correo.xoc.uam.mx

**16.3. V Simposio Internacional en Biología de Nocardia y VI Simposio Internacional de Micetoma**

- Poster

**Biodiversidad Morfológica de Actinomicetos Aislados de la Cascada “Chorro Prieto” en Ichaqueo, Michoacán**

Villalón Fernando<sup>1</sup>, Calderón Lucero<sup>1</sup>, Domínguez Karla<sup>1</sup>, Soria Ricardo<sup>1</sup>, Sandoval Horacio<sup>2</sup>, Sánchez Nora<sup>2</sup>

1. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Químico Farmacobiología. Departamento de Microbiología. Tzintzuntzan 173, Col. Matamoros, C.P. 58240, Morelia, Michoacán.

2. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Departamento de Sistemas Biológicos. Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud. Delegación Coyoacán, C.P. 04960, D.F. México.

#### 16.4. 38° Congreso de la Asociación Mexicana de Microbiología, A.C.

- Poster

##### **Microbiota de Actinomicetos Aislados de la Cascada de “Chorro Prieto”, Ichaqueo, Michoacán**

Villalón Jiménez Fernando<sup>1</sup>, Calderón Lúa Lucero<sup>1</sup>, Domínguez González Karla G.<sup>1</sup>, Soria Herrera Ricardo J.<sup>1</sup>, Sandoval Trujillo A. Horacio<sup>2</sup>, Sánchez Saucedo Nora L.<sup>2</sup>

1. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Químico Farmacobiología. Departamento de Microbiología. Tzintzuntzan 173, Col. Matamoros, C.P. 58240, Morelia, Michoacán.

2. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Departamento de Sistemas Biológicos. Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud. Delegación Coyoacán, C.P. 04960, D.F. México.

## 17. Anexos

**17.1. Medio Extracto de Malta** (Modificado, Karla G. Domínguez, Fernando Villalón, Ricardo J. Soria).

Extracto de Malta	10 g/L	Disolver la cantidad indicada de cada componente para el medio de cultivo en 1.0 litro de agua destilada, esterilizar 15 minutos a 1 atm.
Glucosa	1 g/L	
Extracto de levadura	5 g/L	
Peptona de carne	2 g/L	
Peptona de caseína	4 g/L	
Triptona	1 g/L	
Agar bacteriológico	15 g/L	

**17.2. Caldo Extracto de Malta** (Modificado, Karla G. Domínguez, Fernando Villalón, Ricardo J. Soria).

Extracto de Malta	10 g/L	Disolver la cantidad indicada de cada componente del caldo de cultivo en 1.0 litro de agua destilada, esterilizar 15 minutos a 1 atm.
Glucosa	1 g/L	
Extracto de levadura	5 g/L	
Peptona de carne	2 g/L	
Peptona de caseína	4 g/L	
Triptona	1 g/L	

**17.3. Tinción de Gram** (colorantes Hycel)

1. Realizar frotis.
2. Cubrir de Cristal Violeta 1 minuto.
3. Lavar.
4. Colocar Yodo-Lugol 1 minuto.
5. Lavar.
6. Decolorar con Alcohol-Cetona.
7. Lavar.
8. Agregar Safranina 1 minuto.
9. Lavar.
10. Dejar secar.
11. Observar al microscopio.