

APROXIMACIÓN A LA DIVERSIDAD DE ACTINOBACTERIAS CULTIVABLES
PRESENTES EN LOS NÓDULOS RADICULARES DE *Lupinus sp* Y
EXPLORACIÓN PRELIMINAR DE SU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

DAYANNA ISABEL ARAQUE GELVES

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA
2019

APROXIMACIÓN A LA DIVERSIDAD DE ACTINOBACTERIAS CULTIVABLES
PRESENTES EN LOS NÓDULOS RADICULARES DE *Lupinus sp* Y
EXPLORACIÓN PRELIMINAR DE SU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

DAYANNA ISABEL ARAQUE GELVES

Práctica empresarial
Modalidad pasantía de investigación

Director de trabajo de grado:
Profesor Ph.D. Ramón Ovidio García Rico

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA
2019

Nota de aceptación:

Firma del jurado

Firma del jurado

Agradecimientos

Agradezco al profesor Ph. D. Ramón Ovidio García Rico, por el tiempo dedicado, asesorías, acompañamiento y guía para el correcto desarrollo del presente trabajo. Agradezco a la profesora Ángela Maritza Cajiao Pedraza por su apoyo. Por último agradezco a mis compañeros (as) de GIMBIO y amigas por la ayuda y apoyo que me prestaron.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	8
1. Objetivos.....	10
Objetivo general	10
Objetivos específicos	10
2. JUSTIFICACIÓN.....	11
3. MARCO REFERENCIAL	14
3.1. Marco teórico	14
Leguminosas.	14
Lupinus sp.	14
Productos naturales y enfoques de la medicina tradicional	15
Microorganismos endófitos.....	15
Actinobacterias	16
3.2. Antecedentes.....	18
4. Metodología.....	20
4.1. Toma de muestras.....	20
4.2. Aislamiento de Actinobacterias.....	21
4.3. Caracterización fenotípica	22
4.3.1. Caracterización macroscópica	22
4.3.2. Caracterización microscópica	22
4.4. Caracterización bioquímica.....	23
4.4.1. Utilización de fuentes de carbono	23
4.4.2. Producción de ácido.....	24
4.4.3. Actividad hidrolítica	24
4.4.4. Catalasa.....	25
4.4.5. Reducción de nitratos.....	26
4.5. Potencial biotecnológico	26
4.5.1. Actividad antimicrobiana	26
4.5.2. Producción de pigmentos.....	27

4.5.3. Análisis de extractos crudos por espectrofotometría.....	27
5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	28
6. RESULTADOS	29
6.1. TOMA DE MUESTRAS	29
6.2. AISLAMIENTOS DE CEPAS CULTIVABLES DE ACTINOBACTERIAS.....	30
6.3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA.....	31
6.3.1. Caracterización macroscópica.....	31
6.3.2. Micromorfología.....	51
6.4. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS	59
6.4.1. Utilización de fuentes de carbono.....	59
6.4.2. Producción de ácido.....	62
6.4.3. Actividad hidrolítica	64
6.4.4. Catalasa.....	66
6.4.5. Reducción de nitratos	66
6.5. METABOLISMO SECUNDARIO.....	67
6.5.1. Actividad antimicrobiana.....	67
6.5.2. Producción de pigmentos.....	70
6.5.3. Análisis de extractos crudos por espectrofotometría.....	74
7. ANÁLISIS DE RESULTADOS	75
7.1. Análisis de las características fenotípicas y ubicación taxonómica presuntiva	75
7.1.1. Diversidad de Actinobacterias cultivables.....	84
7.2. Potencial biotecnológico de las cepas aisladas.....	85
7.2.1. Enzimas extracelulares.....	85
7.2.3. Actividad antimicrobiana	86
7.2.4. Producción de pigmentos	89
7.2.5. Análisis de los extractos crudos por espectrofotometría.....	90
8. CONCLUSIONES	93
9. RECOMENDACIONES O SUGERENCIAS.....	95
10. GLOSARIO	96
BIBLIOGRAFIA.....	97

ANEXOS.....102

LISTA DE IMÁGENES

Imagen 1: Potencial biotecnológico de Actinobacterias endófitas.....	09
Imagen 2: Esquema de siembra, para el aislamiento de Actinobacterias.....	21
Imagen 3: Mapa geográfico georreferenciado.....	29
Imagen 4: <i>Lupinus sp.</i>	30
Imagen 5: Aislamiento de Actinobacterias de nódulos de <i>Lupinus sp.</i>	30
Imagen 6: Halos de inhibición.....	69

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Muestreros realizados	20
Tabla 2: Caracterización macroscópica de cepas aisladas de nódulos de Lupinus sp	32
Tabla 3: Micromorfología de las cepas aisladas	51
Tabla 4: Utilización de fuentes de carbono	60
Tabla 5: Producción de ácido a partir de diferentes fuentes de carbono	62
Tabla 6: Actividad enzimática	64
Tabla 7: Actividad antimicrobiana de Actinobacterias aisladas de nódulos	67
Tabla 8: Pigmentos producidos por las cepas	70

LISTA DE GRAFICOS

Grafica 1: Actividad antimicrobiana.....	70
Grafica 2: Diversidad de Actinobacterias cultivables de <i>Lupinus sp</i>	84

TABLA DE ANEXOS

Anexo 1: Composición de medios.....	102
Anexo 2: Tabla de colores.....	104
Anexo 3: Cepas en aisladas de nódulos radiculares en diferentes medios.....	106
Anexo 4: Gráficas de análisis espectrofotométrica del extracto crudo.....	112

INTRODUCCIÓN

Por mucho tiempo los seres humanos se han visto expuestos a diferentes situaciones que pueden afectar su vida e incluso acabarla, como lo son el cáncer, infecciones bacterianas, parasitosis, infecciones fúngicas, tumores, y toxicidad de colorantes sintéticos. Estos problemas son graves ya que para muchos de ellos no hay tratamientos efectivos, en otros casos los medicamentos usados para tratarlos han empezado a dejar de ser eficientes o en su defecto ya no son útiles. El caso más crítico es el de las sustancias con propiedades antibióticas, en 1928 Fleming descubrió por accidente la penicilina, a partir de esta fecha muchos científicos se centraron en purificar dicha sustancia, lo cual no fue posible si no hasta 10 años después. Posteriormente, comenzó la búsqueda de nuevos antibióticos, los cuales se convirtieron en fármacos de uso cotidiano, hasta que en los años 50 (en Japón) se describió la primera resistencia transferible. Desde ese momento, el incremento de la resistencia ha sido dramático. Por ejemplo, en 2014 la OMS reportó 480.000 casos de tuberculosis multirresistente, y recientemente, la misma entidad informó que en Camboya y Tailandia *Plasmodium falciparum* se volvió resistente a casi todos los antipalúdicos (OMS, 2018). De otra parte, se ha demostrado con múltiples estudios que la resistencia a antibióticos antibacterianos en humanos no existía antes de que se empezaran a usar. Antes de la introducción de la penicilina todas las cepas de *Staphylococcus aureus* eran sensibles, actualmente son sensibles menos del 5-10% de las cepas. El mismo fenómeno ha sido descrito para la cefotaxina, la cual a comienzos de la década de los 80 del siglo XX era efectiva para tratar infecciones por cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, actualmente son resistentes el 13 y 16 % respectivamente (Alós, 2014).

Tomando en cuenta la situación descrita, es indiscutible la necesidad de realizar búsquedas de nuevos compuestos obtenidos de fuentes naturales, ya que estos poseen una ventaja clave sobre los sintetizados químicamente, y es la diversidad de estructuras químicas que pueden llegar a generar, haciéndolos una fuente potencial de nuevos compuestos con actividad biológica (Demain, 2014). Esta necesidad ha estimulado en los años recientes las investigaciones sobre la diversidad biológica y los recursos genéticos, ejercicio que si se hace con miras a desarrollar una aplicación comercial biotecnológica se considera bioprospección (Torres & Velho, 2009) una actividad que hoy en día tiene implicaciones sociales, culturales, económicas, jurídicas y hasta políticas. Esta estrategia, tan común y necesaria en el mundo actual, tiene mejores posibilidades de éxito, si se realiza sobre hábitats extremos, o poco o nada explorados; ya que estos factores aumentan la posibilidad de encontrar nuevas cepas biológicas con potencial biotecnológico y

a su vez las moléculas que generen pueden ser resistentes a las condiciones a las que estaban expuestos (Fuenzalida & Ramos, n.d.; Mason *et al.*, 2016).

Las Actinobacterias se han caracterizado por su gran potencial metabólico, ya que producen una amplia gama de compuestos bioactivos incluyendo antibióticos, antitumorales, inmunosupresores, antivirales, antifúngicas, antiparasitarios, herbicidas, insecticidas, antibioincrustantes, promotores de crecimiento en plantas, enzimas industriales importantes, hormonas, vitaminas, larvicidas, anticancerígenos y pigmentos, entre otros (Imagen 1) (Dholakiya, Kumar, Mishra, Mody, & Jha, 2017; Harir *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2012; León *et al.*, 2016; Qin *et al.*, 2009; Salam *et al.*, 2017; Sr & Rao, 2012; W. Wei *et al.*, 2018).

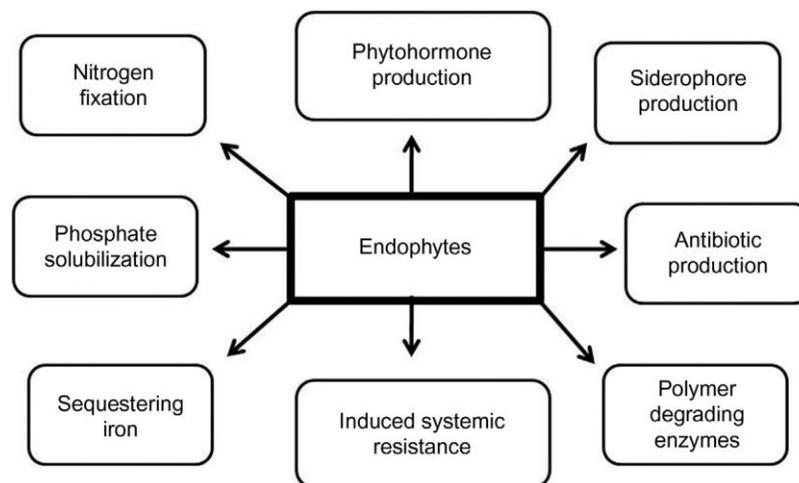


Imagen 1: Potencial biotecnológico de Actinobacterias endófitas. Tomado de Ganapathy y colaboradores.

Este gran potencial, unido a su gran ubicuidad las convierte en uno de los objetos de búsqueda preferidos por parte de los programas de bioprospección, especialmente si se llevan a cabo en hábitats considerados poco explorados. Por lo anterior, el presente trabajo estaba enfocado al aislamiento, caracterización fenotípica y exploración del potencial biotecnológico de las Actinobacterias que habitan los nódulos radiculares de plantas, en este caso particular *Lupinus sp*, con el fin de generar información acerca de la diversidad y utilidad de este grupo bacteriano.

1. Objetivos

Objetivo general

Caracterizar y evaluar el potencial biotecnológico de Actinobacterias aisladas a partir de nódulos radiculares de la planta *Lupinus sp.*

Objetivos específicos

1. Estudiar las cepas aisladas a partir de nódulos radiculares de *Lupinus sp.* , en cuanto a sus características microscópicas, macroscópicas y bioquímicas.
2. Realizar, presuntivamente, la ubicación taxonómica de las diferentes cepas aisladas y caracterizadas.
3. Estimar el potencial biotecnológico de las cepas aisladas a través del análisis de ensayos de actividad antimicrobiana, producción de pigmentos y caldos de fermentación.

2. JUSTIFICACIÓN

Uno de los problemas de la sociedad actual es la toxicidad de los colorantes sintéticos actualmente usados en la industria alimentaria y farmacéutica, los cuales causan diversos efectos desfavorables en la salud, como lo son: falta de atención, hiperactividad, trastornos de sueño e incluso agresividad en niños, por tal motivo se hace necesaria la búsqueda de diversos pigmentos naturales, los cuales no posean ningún efecto adverso (Ngamwonglumlert, Devahastin, & Chiewchan, 2017). De otro lado también existe un problema actual y global de gran preocupación, que es el aumento en la resistencia a antibióticos por parte de diferentes microorganismos patógenos, el cual es una constante y gran amenaza para la salud humana e inocuidad alimentaria, ya que puede afectar a todas las personas sin importar su edad, sexo, etnia y estrato socioeconómico. En los últimos años la magnitud del problema ha aumentado de manera acelerada debido al uso irresponsable e indiscriminado de antibióticos tanto en humanos como en animales, cuyas consecuencias se ven reflejadas en infecciones como neumonía, tuberculosis, salmonelosis, septicemia o enfermedades de transmisión alimentaria, donde cada vez son más difíciles y a veces imposibles de tratar. Tal es la magnitud de este problema que la OMS emitió una alerta sobre la resistencia a los antibióticos de bacterias y consideran que para el 2050 esta será la causa principal de muerte. Pero estos no son los únicos retos a los que se exponen los seres humanos ya que también se hacen necesaria la búsqueda de compuestos anticancerígenos ya que en Colombia en el periodo comprendido entre 2003-2012, se registraron 157.017 muertes en hombres y 162.310 en mujeres, en un promedio de 15.700 muertes anuales por cáncer en hombres y 16.230 en mujeres (Aguilera López *et al.*, 2017). En contraste con esto en Estados Unidos estimaban que en 2018 se diagnosticarían 1.735.350 casos nuevos de cáncer y 609.640 personas murieran a causa de esta enfermedad datos tomados del Instituto Nacional del Cáncer. Como consecuencia de lo anteriormente enmarcado los científicos se han dedicado a la búsqueda de nuevos compuestos de uso farmacéutico con el fin de dar solución a los problemas previamente citados, recalando que en la actualidad existen diferentes estrategias para desarrollar nuevos fármacos como lo son la química combinatoria y el desarrollo de fármacos por fragmentos las cuales no han sido productivos, mientras que la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos ha sido exitosa, ya que se demostró que la mayoría de nuevos fármacos provienen de productos naturales, aunque en los últimos años el descubrimiento de nuevas moléculas había descendido, al enfocar los estudios a hábitats o materias ya analizadas, lo que generaba el aislamiento de cepas anteriormente descritas y por ende los mismos compuestos activos, por tal razón se modificaron las técnicas de selección y objetos

de estudios enfocados a fuentes nunca antes exploradas (Goodfellow & Fiedler, 2010; Goodfellow *et al.*, 2012).

La principal fuente de estudio para la producción de metabolitos activos han sido las plantas, ya que muchas de ellas tienen propiedades de interés para ser usadas en la etnomedicina, enfatizando que cerca de un millón de productos naturales, el 25% son biológicamente activos y de estos, alrededor del 60% son de plantas (Demain, 2014).

En la actualidad los microorganismos endófitos son considerados como una fuente potencial de metabolitos secundarios, ya que estos microorganismos tienen la capacidad de colonizar y desarrollar parte o la totalidad de su ciclo de vida en los tejidos internos de su planta hospedera, siendo este un ambiente inusual, creando un nicho ecológico único. Los microorganismos endófitos son una fuente de estudio poco explorada, ya que hasta la fecha los estudios realizados de diversidad endófitas han sido en un número reducido de plantas, en este sentido se conoce que existen 300.000 especies de plantas, de las cuales cada una posee uno o más microorganismos endófitos, y que su población endófitas también se ve influenciada por su localización geográfica y condiciones ambientales a las cuales está expuesta, estos factores genera una diversidad enorme, y aumenta la posibilidad de encontrar nuevas especies con potencial biotecnológico (Qin, Xing, Jiang, & Xu, 2011; Salam *et al.*, 2017; Stroble & Daisy, 2003). Conociendo esta información antes de realizar un estudio de este tipo se debe escoger cuidadosamente la planta de estudio, para este proceso de selección se escogen todas aquellas que cumplan alguna o varias de las características que se mencionan: 1) Una planta que crezca en un ambiente inusual 2) Una planta con característica etnobotánicas. 3) Plantas con longevidad rara o que habiten tierras viejas 4) Plantas que crezcan en un área con buena diversidad (Stroble & Daisy, 2003). Las plantas del género ***Lupinus sp*** se convierten en un blanco interesante, ya que estas plantas tienen la capacidad de crecer en suelos con un bajo contenido de humedad y nutrientes, son productoras de diferentes compuestos bioactivos entre los cuales encontramos antimicrobianos, antioxidantes, insecticidas, antifúngicas y herbicidas, agregando que pueden ser utilizados en la dieta humana gracias a su alto nivel de proteínas y su valor nutricional, así como también puede ser usada en rotación de cultivos gracias a su potencial para fijar nitrógeno (Mazutti *et al.*, 2018).

De acuerdo a lo anteriormente citado y teniendo como referente el estudio realizado en España por Martha y colaboradores en 2010 en el cual observaron la presencia de colonias de Actinomycetes con pigmentación naranja mientras realizaban un

estudio de ecología de bacterias fijadoras de nitrógeno en nódulos de **Lupinus angustifolius**, dichas colonias fueron analizadas por métodos moleculares y determinaron que correspondían al género **Micromonospora sp** (Trujillo *et al.*, 2010), con base a esto se tomó como objeto de estudio Actinobacterias endófitas de nódulos, las cuales se caracterizan por ser uno de los taxones más diversos del dominio Actinobacteria, ser Gram positivas y poseer un alto contenido de G-C, siendo reconocidas por su gran potencial para producir compuestos bioactivos y enzimas comerciales de importancia industrial (Fuenzalida & Ramos, n.d.). Este gran potencial se debe a que el genoma de ciertas especies pertenecientes a este filo poseen alrededor de 20 o más *clusters* de genes biosintéticos de metabolitos secundarios algunos de ellos son los genes de policétido sintasa y sintetasa del péptido no ribosomal (Golinska *et al.*, 2015) mientras que bacterias como **Bacillus** y **Pseudomonas** solo poseen 3 y 4 grupos respectivamente (Goodfellow & Fiedler, 2010). Además de esto, un aspecto importante de las Actinobacterias es que son las productoras de más del 45 % de compuestos bioactivos microbianos, estos datos concuerdan con la Base de Datos de antibióticos que desde 1900 el 50% de las moléculas registradas han sido producidas por actinomicetos, recalcando que el mayor productor con un 80% es el género **Streptomyces** (Goodfellow & Fiedler, 2010; Goodfellow *et al.*, 2012).

3. MARCO REFERENCIAL

3.1. Marco teórico

Leguminosas. Son una de las familias más numerosas e importantes del reino vegetal, debido a la gran cantidad de sustancias que suministran a la medicina y a la economía doméstica. Entre las leguminosas encontramos plantas medicinales, comestibles y venenosas. Desde su aparición en la tierra, las leguminosas junto con los cereales y algunas frutas, han sido la base esencial de la alimentación humana. Las leguminosas tienen una gran diversidad, y por tal motivo muchas de ellas se han encontrado en regiones desfavorables como lo son altas temperaturas, precipitación extrema y suelos de baja fertilidad. Las leguminosas se caracterizan por su capacidad para fijar nitrógeno en simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno, y por tal motivo son usadas en recuperación de suelos pobres, suelo degradados y en rotación de cultivos (Rodríguez, 2008).

Lupinus sp. *Lupinus* proviene del latín “lupus” que significa lobo, esto hace referencia a la voracidad que tienen estas plantas para usar nutrientes del suelo no disponible para otras plantas. También es conocida con el nombre Altramuz, Tremoco o Tervis (Rodríguez, 2008). Esta planta pertenece a la familia *Fabaceae* subfamilia *Lotoidea*, tribu *Genisteae* (Barney Duran, 2011; Rodríguez, 2008). El género *Lupinus* tiene alrededor 250 especies de hierbas y arbustos distribuidos en el área mediterránea de España y el continente americano, las cuales son noduladas por ***Bradyrhizobium*** (Trujillo *et al.*, 2010). Informes de herbarios muestran que las especies silvestres de América son comúnmente herbáceas erectas y hábitos rastreros, postrados, semipostrados, y más raramente leñosas, hojas de diferentes tamaños y flores en colores que van desde azul violeta a rosa, naranja, amarillo e incluso blanco, las vainas en grupos y en distintitos tamaños, las semilla pueden ser lisas o rugosas, blancas o cafés, y poseen diversos tamaños (Barney Duran, 2011). *Lupinus* es una leguminosa, que ha sido usada como base proteica en la alimentación humana y animal, desde tiempo antiguos, además de esto ha sido empleada como abono verde, forraje, alimento humano después de someterse a un proceso de lixiviación de los alcaloides. Una características importante de las leguminosas es su capacidad de fijar nitrógeno en simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno, presentes en el nódulo. Estas son hierbas anuales o vivaceas (Rodríguez, 2008). Una característica importante es que *Lupinus* se adapta con facilidad a condiciones de estrés, como son suelos pobres, sequias, heladas y concentraciones altas de metales (Lee, Chan, Stach, Wellington, & Goh, 2018; Rodríguez, 2008). Muchas especies pertenecientes a este género han sido

usadas en rotación de cultivos ácidos, debido a su capacidad para mantener el pH de los suelos en 5,5 (Barney Duran, 2011; Rodríguez, 2008). Agregando que han sido usadas para recuperación de suelos ácidos procedentes de minas de carbono y suelos con altas cantidades de aluminio, ya que son capaces de resistir concentraciones que son tóxicas para la mayoría de plantas (Rodríguez, 2008).

Productos naturales y enfoques de la medicina tradicional. Los productos naturales son naturalmente derivados de metabolitos y/o productos de microorganismos, plantas y animales. Estos productos han sido explotados por los humanos por mil años, y las plantas han sido el objeto principal de estudio en la medicina. Hoy en día la mayoría de usuarios de la medicina tradicional son chinos, con más de 5000 plantas y productos de plantas. Un ejemplo de productos obtenidos de plantas, es la aspirina (Ácido salicílico), el cual se obtiene de especies de plantas *Salix* y *Populus*. Entre 1989 y 1995 el 68 % de agentes antibacterianos eran de origen natural (Stroble & Daisy, 2003). Cerca del 28 % de nuevas entidades químicas y el 42% de drogas anti cáncer introducidas en el mercado en el tiempo comprendido entre 1981 y 2006 fueron de productos naturales y sus derivados (Qin *et al.*, 2011). La mayoría de las industrias de fármacos han perdido el interés en la búsqueda de productos naturales, y utilizan la química combinatoria. El motivo de esto es el enorme esfuerzo y gasto que conlleva tomar y escoger una fuente biológica, aislar el producto natural, elucidar la estructura y comenzar a producirlo. Los productos naturales son pioneros en compuestos, ofreciendo una amplia diversidad de estructuras incomparables incluso con la química combinatoria, además de esto los productos naturales son una fuente infinita de nuevos compuestos con actividad contra patógenos (Sr & Rao, 2012; Stroble & Daisy, 2003).

Microorganismos endófitos. El término endófito hace referencia a microorganismos asociados a plantas, a través de una relación simbiótica en la cual la planta hospedadora no va a verse afectada negativamente; entre los microorganismos endófitos se incluyen hongos, bacterias y actinobacterias (Ganapathy & Natesan, 2018). Los endófitos son usualmente vistos como una fuente excepcional de productos naturales bioactivos, ya que ellos ocupan millones de nichos ecológicos únicos (plantas superiores), creciendo en ambientes inusuales (Stroble & Daisy, 2003). Existen cerca de 300.000 especies de plantas en la tierra, de las cuales cada una posee uno o más microorganismos endófitos, creando una enorme diversidad (Qin *et al.*, 2011). La diversidad endófitica de la mayoría de las plantas no ha sido estudiada hasta ahora, por lo cual existen muchas oportunidades de encontrar nuevas especies. Por tal motivo los endófitos son una fuente de

diversidad genética, y nuevas especies no descritas (Stroble & Daisy, 2003). Las bacterias endófitas han demostrado tener diversos efectos benéficos entre las plantas, entre los cuales encontramos aumento en la disponibilidad de nutrientes, como nitrógeno, fósforo, promoción del crecimiento de la planta a través de la producción de fitohormonas y enzimas hidrolíticas. Además de esto protegen a la planta hospedadora de infección de patógenos a través de antibiosis e inducción de resistencia sistemática (Ganapathy & Natesan, 2018; Kim *et al.*, 2012).

Actinobacterias El filo Actinobacteria es ubicuo, y esto se ha demostrado ya que ha sido aislado de múltiples hábitats como: suelos alcalinos, suelos salinos, suelos ácidos, suelos de bosques, rizosfera, manglares, cultivos, desiertos, tejidos internos de plantas, animales, lagos, ríos, sedimentos marinos, costas, aguas residuales, aguas frescas, minas, entre otros (Dholakiya *et al.*, 2017; Fatahi-Bafghi *et al.*, 2018; Hurtado, Pacheco, Sheen, & Ugarte, 2018; Iniyan, Kannan, & Vincent, 2017; Jiang *et al.*, 2018; León *et al.*, 2016; Rateb, Ebel, & Jaspars, 2018). Siendo uno de los más grandes del dominio Bacteria. Este filum posee 5 clases, 19 ordenes, 50 familias y 221 géneros (Goodfellow, 2012). Las Actinobacterias son microorganismos tan diversos que pueden presentar respiración aerobia, anaerobia facultativa o anaerobia, así como también pueden ser Gram positivos o Gram variables, los cuales tienen una pared celular rígida que contiene ácido murámico y algunos contienen ácidos teicoicos. La mayoría son quimio-organótrofos que crecen a pH neutro, pero algunas cepas son acidófilas o alcalófilas. Otros son halófilos y algunos son termófilos. El filo incluye organismos fenotípicamente diversos que muestran diversas propiedades morfológicas que van desde cocos hasta micelios altamente diferenciados. La mayoría son saprófitos, pero algunos son patógenos para plantas y animales. El contenido de ADN G + C varía desde poco menos del 50% en moles hasta más del 70% en moles (Goodfellow *et al.*, 2012).

Las Actinobacterias al ser microorganismos endófitos pueden encontrarse en diversas partes de la planta hospedadora (raíz, hojas, tallos y flores), se cree que la colonización de las Actinobacterias se puede dar desde la raíz o la parte aérea de la planta, y dicho proceso de colonización se ve influenciado por las condiciones climáticas y la localización geográfica (Ganapathy & Natesan, 2018).

Las Actinobacterias se han caracterizado por la capacidad de producir metabolitos bioactivos como antimicrobianos, antitumorales, inmunoestimulantes, antiparasitarias, antivirales, inmunosupresores, antifúngicos, antibioincrustantes, insecticidas, promotores de crecimientos en planta, compuestos herbicida e inhibidores enzimáticos (Dholakiya *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2012; León *et al.*, 2016;

W. Wei *et al.*, 2018) . Además de esto también son reconocidos por producir enzimas extracelulares como lipasas, fosfolipasas, nucleasas, proteasas, amilasas, quitinasas, lignina-hidrolasas, celulasas, lacasas (Martínez, Aguilar, & Enríquez, 2017; Revollo, Serna, & Hernández, 2012).

En 2005 Berdy reporto 22.500 metabolitos bioactivos, de los cuales 10.100 son producidos actinomicetes. Los géneros de ***Streptomyces sp***, ***Nocardia sp***, ***Micromonospora sp***, ***Saccharothrix sp***, son considerados los más eficientes para producir metabolitos secundarios antimicrobianos. Algunos de los metabolitos secundarios, incluyendo daptomicina (***Streptomyces roseosporus***), lincomicina (***Streptomyces lincolnensis***), estreptomycin (***Streptomyces griseus***), vancomicina (***Streptomyces orientalis***) y gentamicina (***Micromonospora purpurea***) son muy usados contra patógenos (Fatahi-Bafghi *et al.*, 2018).

3.2. Antecedentes

El estudio de las Actinobacterias es un tema actual y global, ya que estos microorganismos son productores de varios compuestos bioactivos, encontrándose en diferentes hábitats, como son ambientes marinos (Dholakiya *et al.*, 2017; León *et al.*, 2011; Leon *et al.*, 2007; Nie *et al.*, 2018; Sarmiento-vizca *et al.*, 2017; Sr & Rao, 2012; Tarazona, Jorge, Nadia, Vallejo, & Marguet, 2017), animales (León *et al.*, 2016), minas (Hurtado *et al.*, 2018), suelos y plantas. Como referente para el presente trabajo se tomaron en cuenta los trabajos realizados en suelos y plantas. A nivel de suelos han realizado diferentes trabajos en los cuales han aislado una gran cantidad de cepas de Actinobacterias con potencial biotecnológico ya que producen enzimas extracelulares (Martínez *et al.*, 2017; Revollo *et al.*, 2012), actividad antimicrobiana frente a cepas patógenas (Martínez *et al.*, 2017; Parada, Marguet, & Vallejo, 2017), actividad fungicida (Martínez *et al.*, 2017) y larvicida (Pathalam *et al.*, 2017). Además de esto las Actinobacterias pueden estar presentes en diferentes tipos de suelos, ya que han sido aisladas de suelos semiáridos (Jose, Suzana, Katia, Marcos, & Claudia, 2017), desiertos (Fatahi-Bafghi *et al.*, 2018; Harir *et al.*, 2017; Rateb *et al.*, 2018), rizósfera (Mingma, Pathom-aree, Trakulnaleamsai, Thamchaipenet, & Duangmal, 2014; Trujillo, 2013) y rizósfera halófila (Iniyan *et al.*, 2017). Una investigación interesante fue la realizada en 2014 por Ratchane donde estudio dos hábitats diferentes (plantas y rizósfera) encontrando que las cepas que se encontraban en la raíz poseían mayor actividad antimicrobiana que las aisladas de rizósfera (Mingma *et al.*, 2014). Se ha demostrado que las plantas son una de las fuentes más promisorias para aislar Actinobacterias nuevas y con potencial biotecnológico, algunas de las plantas usadas para el aislamiento de Actinobacterias son plantas medicinales en las cuales lograron aislar 2174 Actinobacterias (Qin *et al.*, 2009), como ejemplo más específico está el aislamiento de 304 Actinobacterias de ***Dracaena cochinchinensis Lour***, donde evidenciaron diferentes metabolitos secundarios entre los que se encontraba la antraciclina (compuesto antitumoral), fungicidas y compuestos con actividad citotóxica (Salam *et al.*, 2017). También se han logrado aislar Actinobacterias de plantas herbáceas donde varias cepas presentaron actividad antimicrobiana (Kim *et al.*, 2012), de plantas de mangrove (Jiang *et al.*, 2018) y cultivos de Te (W. Wei *et al.*, 2018). Algunos de los géneros que han sido aislados de plantas son ***Dactylosporangium, kineosporia, kineococcus, herbidospora, jiangella, Promicromonospora, Steptomyces, Pseunocardia, Nocardiposis, Micromonospora, Amycolaptosis, Nocardia, Nonomuraea, Actinomadura, Rhodococcus, Gordonia, Mycobacterium, Microbispora, Micrococcus, Microbacterium, Streptacidiphilus, Arthrobacter, Dietzia, Herbiconiux, Kitasatospora, Rathayibacter, Tsukamurella, Brevibacterium, Brachybacterium, Kocuria, Nocardioides, Marmoricola, Actinoplanes, Agrococcus, Amnibacterium,***

Citricoccus, Glutamicibacter, Gordonia, Isoptericola, Janibacter, Leucobacter, Pseudokineococcus, Sanguibacter, Verrucosispora, Pseudarthrobacter y ***Saccharomonospora*** (Jiang *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2012; Qin *et al.*, 2009; Salam *et al.*, 2017; W. Wei *et al.*, 2018).

Los nódulos han resultado ser una de las partes más interesantes para aislar Actinobacterias, ya que son una fuente promisoría de nuevas cepas, han mostrado tener una amplia diversidad y un gran potencial biotecnológico. Algunas de las nuevas cepas aisladas de nódulos son: ***Microbacterium shaanxiense sp. nov.*** (G. Wei *et al.*, 2015), ***Kribbella lupini sp. nov.*** (Trujillo, Kroppenstedt, Schumann, & Marti, 2006), ***Frankia inefficax sp. nov.*** (Nouioui, Maria, Rohde, Tisa, & Gtari, 2017), ***Frankia discariae sp. nov.*** induce la formación de nódulos (Nouioui, Montero, *et al.*, 2017), ***Frankia asymbiotica sp. nov.***, tiene la capacidad para fijar nitrógeno (Nouioui, Gueddou, *et al.*, 2017) ***Micromonospora ureilytica sp. nov.***, ***Micromonospora noduli sp. nov.***, ***Micromonospora vinacea sp. nov.*** (Carro, Riesco, *et al.*, 2019), ***Micromonospora phytophila sp. nov.*** y ***Micromonospora uteiviridis sp. nov.*** de la planta ***Pisum Sativa*** (Carro, Veyisoglu, *et al.*, 2019). En cuanto al potencial biotecnológico, varias cepas aisladas de nódulos de ***Alnus glutinosa, Casuarina glauca*** y ***Elaeagnus angustifolia***, poseían diferentes características que las hacían aptas para ser usadas en procesos de biocontrol de enfermedades de suelo y proteger las raíces de colonización por cepas patógenas (Ghodhbane-Gtari *et al.*, 2010). Cepas aisladas de nódulos de leguminosas tienen la capacidad para aumentar la concentración de nitrógeno y peso seco, así como también estimular el crecimiento y nodulación de la alfalfa (Le, Franco, Ballard, & Drew, 2016). Para concluir se resaltan dos géneros que han sido ampliamente estudiados en nódulos, los cuales son ***Micromonospora*** y ***Frankia***, el género ***Micromonospora*** ha sido aislado de nódulos de diferentes plantas entre las cuales encontramos ***Lupinus angustifolius*** (Trujillo *et al.*, 2010), ***Pisum sativa*** (Carro, Spröer, Alonso, & Trujillo, 2012), ***Medicago Sativa*** donde determinaron que este género incrementa la nodulación, mejora la obtención de nitrógeno, promueven el crecimiento aéreo, la proporción entre brotes y raíces, y elevan los niveles de nutrientes esenciales (Martinez Hidalgo, Galindo Villardón, Trujillo, M, & Martinez Molina, 2014). Resaltando que en diferentes estudios han afirmado que la diversidad de este género varía entre especies de planta y área geográfica estudiada, en cuanto a ***Frankia*** su importancia recae en que induce la nodulación en leguminosas, el proceso de nodulación depende de la diversidad y cantidad de ***Frankia*** endófitas mas no de las que estén en la rizosfera (Pokharel, Mirza, & Dawson, 2011; Tekaya *et al.*, 2017). Otro dato importante es que las especies de ***Frankia*** presentes en la planta huésped depende de las condiciones ambientales del suelo y genotipo de la planta huésped (Pokharel *et al.*, 2011).

4. Metodología

4.1. Toma de muestras

Los nódulos utilizados para este estudio fueron recolectados de las raíces ramificadas de plantas *Lupinus sp*, las cuales se encontraban en tres puntos diferentes, los cuales poseen las siguientes coordenadas 7°22'25.8"N 72°38'05.9"W; 7°21'54.43524"N 72°37'37.83288"W; 7°21'50.3"N 72°37'37.8"W. Posteriormente los nódulos se sometieron a un proceso de limpieza que consistió en lavar con abundante agua, hasta eliminar toda los restos de tierra y materia orgánica, posteriormente los nódulos fueron separados de las raíces, realizado esto se escogieron los nódulos que presentaban una coloración rosada y se conservaron en glicerol al 30 % a -20°C para mantenerlos viables hasta el día del uso. Se realizaron 3 muestreos diferentes, los cuales se encuentran en la tabla 1.

Tabla 1: Muestreos realizados

Fecha de muestreo	Sitio de muestreo	Especímenes recolectados	Cantidad de nódulos por espécimen	Nódulos procesados
Enero de 2017	1	1	8	2
	2	1	9	2
	3	1	4	2
Junio de 2017	1	1	10	4
	2	1	15	3
	3	1	6	2
Marzo de 2018	1	1	9	4
	2	1	7	4
	3	1	8	4

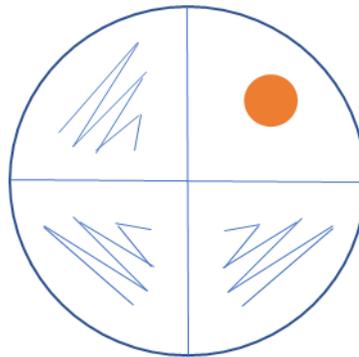
En la tabla se observan las diferentes fechas en las que se realizaron los muestras en los diferentes puntos, el sitio 1) 7°22'25.8"N 72°38'05.9"W; 2) 7°21'54.43524"N 72°37'37.83288"W; 3) 7°21'50.3"N 72°37'37.8"W, el número de especímenes hace referencia al número de plantas recolectas, y se hace enfoque en número de nódulos obtenidos y procesados porque no todos los nódulos obtenidos fueron procesados.

Los nódulos procesados fueron todos aquellos que presentaran una coloración rosada, la cual indica que están activos y los microorganismos presentes están vivos.

4.2. Aislamiento de Actinobacterias

Para el proceso de obtención de Actinobacterias de nódulos de *Lupinus sp*, se procedió a esterilizar el nódulo, sumergiéndolo en cloruro de mercurio al 2% por un minuto, seguidamente se realizaron seis lavados con solución salina al 0.85 % por dos minutos por lavado, con el objetivo de eliminar los residuos de cloruro de mercurio. Seguidamente se pasó el nódulo a una placa de Petri estéril donde se maceró con una varilla de vidrio, con esta misma se tomó el inóculo para sembrarlo en forma de Ziz-Zac en 3 de los 4 cuadrantes de la placa con YMA (Anexo 1), después de realizar este procedimiento se tomó un trozo del nódulo macerado y se depositó en el último cuadrante con el objetivo de comprobar el proceso de esterilización (imagen 1). Todas las placas se incubaron a 28°C por 1 mes.

Imagen 2: Esquema de siembra, para el aislamiento de Actinobacterias



En la imagen se observa el modelo de siembra empleado para el aislamiento. Fuente: Autor

Completado el tiempo de incubación se seleccionaron las colonias con características morfológicas típicas de Actinobacterias para ser sembradas en agar Avena (Anexo 1), con el objetivo de obtener cultivos puros. Dichas placas se incubaron a 28 °C por 15 a 21 días. Metodología adaptada a la usada por (Trujillo *et al.*, 2010).

La conservación de cepas se realizó con cada una de las cepas aisladas, las cuales fueron sembradas masivamente en medio YSA (Anexo 1), incubadas a 28 °C por 15 días, pasado el tiempo de incubación se recolectó la biomasa y se depositó en tubos eppendorf de 2 ml que contenían glicerol estéril al 40 % y se llevaron a -20 °C.

4.3. Caracterización fenotípica

4.3.1. Caracterización macroscópica

Se procedió a sembrar cada una de las cepas por agotamiento en tres medios de cultivo diferentes: ISP 1 modificado (Anexo 1) el cual se llamara de aquí en adelante como ISP1-M, ISP 2 modificado (Anexo 1) el cual se nombrará en el documento como ISP2-M, la modificación de los dos medios anteriores se encuentra en la adición de 1 ml de solución se de sales trazas (Anexo 1), y el medio ISP4 (Anexo 1). Todos los medios sembrados se incubaron a 28 °C por 15 días, y se procedió a revisar las características (color, forma, borde y elevación) de las cepas a los siete y 15 días, la determinación del color de cada cepa se hizo con la tabla de colores ISCC-NDS (Anexo 2) (Harir *et al.*, 2017). Metodología adaptada a la usada por (Hurtado *et al.*, 2018; León *et al.*, 2016; Parada *et al.*, 2017)

4.3.2. Caracterización microscópica

Para determinar la micromorfología de las cepas de estudio se procedió a realizar 2 métodos de microcultivos diferentes y se observaron al microscopio en 3 periodos de tiempo diferentes como se describe a continuación.

4.3.2.1. Microcultivos método 1

Se sembró cada una de las cepas en medio YSA masivamente e inmediatamente se cortó con bisturí estéril dos cuadros de 1 cm * 1 cm de agar sembrado, estos se colocaron sobre un portaobjetos estéril y se cubrió con un cubreobjetos estéril. Posteriormente se llevaron a incubar a 28 °C y a los ocho y 15 días se realizaron montajes retirando el cubreobjetos y poniéndolo sobre un portaobjetos con una gota de ácido láctico. Todos los montajes realizados fueron observados en el microscopio de contraste Nikon eclipse 80i, en los aumentos de 20X, 40X y 100X.

4.3.2.2. Microcultivos método 2

Se insertaron dos cubreobjetos estériles en un ángulo de 45 ° en medio YSA, posteriormente se sembraron las cepas de interés en el sitio de inserción del cubreobjetos, seguidamente se incubaron a 28 °C por 3 semanas, y se revisaron a

los 15 y 21 días. Los montajes se hicieron de la misma manera que en el método 1. Metodología adaptada a la usada por (Harir *et al.*, 2017). Todos los montajes realizados fueron observados en el microscopio de contraste Nikon eclipse 80i, en los aumentos de 20X, 40X y 100X.

4.3.2.3. Tinción de Gram

Sobre un porta objetos limpio con una gota de agua se depositó una colonia la cual se mezcló con el agua hasta formar una mezcla homogénea, posteriormente se fijó la muestra, y se adicionó cristal violeta por 1 minuto, pasado este tiempo se retira el exceso y se lava con agua destilada estéril, seguidamente se añade lugol y se deja reposar 1 minuto, se lava con agua destilada y se adiciona alcohol cetona por 30 segundos, pasado este tiempo se lava de nuevo la muestra y se agrega safranina por 1 minuto, por último se lavó el porta objetos y se dejó secar para posteriormente observar al microscopio en un aumento de 100x. Los resultados fueron tomados con base a la coloración tomada por las estructuras, reportándose como Gram positivas todas las cepas que presentaron pigmentación morada y Gram negativas cuando se observaba las estructuras de color rojo.

4.4. Caracterización bioquímica

La caracterización bioquímica se realizó con el fin de determinar algunas propiedades biológicas, este numeral se subdivide en cuatro conjuntos de pruebas, los cuales son: 1. Utilización de fuentes de carbono, 2. Producción de ácido, 3. Actividad hidrolítica y 4. Otras: catalasa y reducción de nitratos.

4.4.1. Utilización de fuentes de carbono

Este análisis consistió en la preparación de un medio mínimo (Anexo 1) suplemento con el 1 % de la fuente de carbono a estudiar. Las fuentes de carbono utilizadas fueron: acetato de sodio, citrato de sodio, D-fructosa, D-galactosa, D-glucosa, D-manitol, D-manosa, D-ribosa, D-xilosa, glicerol, inositol, lactosa, L-arabinosa, L-ramnosa, maltosa, sacarosa y sorbitol. Cada una de las cepas se sembró en los medios y se incubaron a 28 °C por un mes, pasado este tiempo procedió a leer los resultados, considerándose positivas todas las cepas que presentaran crecimiento. Metodología adaptado a la usada por (Jose *et al.*, 2017; Rodríguez, 2008; Sr & Rao, 2012).

4.4.2. Producción de ácido

Este test consistió en la utilización un medio mínimo (Anexo 1) suplementado con el 1% de las fuentes de carbono, se inocularon cada una de las cepas de interés por punción y se incubó a 28 °C por un mes. Pasado el tiempo de incubación se observó la presencia o ausencia de cambio de color en cada una de las pruebas. Siendo positivos todos aquellos tubos que viraron a amarillo, levemente positivos aquellos en los que observa un cambio en el color del tubo y negativos todos los conservaron coloración violeta. Las fuentes de carbono probadas fueron D-glucosa, D-manosa, D-manitol, D-xilosa, glicerol, lactosa, maltosa y sacarosa.

4.4.3. Actividad hidrolítica

Se determinó la presencia de cinco enzimas extracelulares, las cuales fueron ureasas, esculinasa, amilasas, caseinasas y gelatinasas.

4.4.3.1. Hidrolisis de urea

Se sembró por punción en medio urea de Oxoid (Anexo 1) cada una de las cepas de interés y se incubaron a 28 °C por 15 días. Considerándose positivos todos los tubos que presentaron coloración fucsia y negativo todos los que presentaban coloración amarilla.

4.4.3.2. Hidrolisis de esculina

Se sembró por punción cada una de las cepas en agar esculina de Oxoid suplementado con 3 g/l de extracto de levadura y se incubó a 28 °C por 28 días, pasado el tiempo de incubación se observó la presencia (positivo) o ausencia (negativo) de un halo negro alrededor de la colonia.

4.4.3.3. Hidrolisis de almidón

Cada una de las cepas se sembraron por punción en medio ISP 4 modificado y SA 1 (Anexo 1) se incubaron a 28 ° C por 15 días, los resultados se revelaron adicionando lugol sobre la colonias, consideraron positivas todas aquellas que presentaron halo alrededor de la colonia. Metodología adaptada a la usada por (Harir *et al.*, 2017; León *et al.*, 2016; Rodríguez, 2008).

4.4.3.4. Hidrolisis de caseína

Se sembró por punción cada cepa de interés en medio SA 1 (con 2 g/L de almidón) suplementado con 28 g/L Skim Milk Powder, se incubaron a 28 °C por 15 días, pasado el tiempo de incubación se procedió a leer los resultados. Se consideraron positivas todas las cepas que presentaron un halo. Metodología adaptada a la usada por (León *et al.*, 2016; Rodríguez, 2008).

4.4.3.5. Hidrolisis de gelatina

Se preparó el medio gelatina de la Merck y las cepas fueron sembradas por punción las cepas, posteriormente se incubaron a 28 °C por un mes, pasado este tiempo se procedió a leer la prueba con la solución cloruro de mercurio acido (Anexo 1). Se consideraron positivos todos los tubos que no presentaron coloración blanca después de adicionar la solución de revelado. Metodología adaptada a la usada por (Harir *et al.*, 2017; León *et al.*, 2016; Rodríguez, 2008).

4.4.4. Catalasa

Este ensayo tuvo dos réplicas biológicas, las cuales consistían en tomar una colonia aislada y colocarla sobre un porta objetos limpio, posteriormente se añadió 100 µl de peróxido de hidrogeno, y se observó la formación de burbujas.

4.4.5. Reducción de nitratos

Se evaluó usando el medio semisólido nitratos (Anexo 1), en el cual se inóculo cada cepa de interés a través de siembras por punción y se incubaron a 28 °C por 17 días, pasado este tiempo se adicionó reactivo de Griess Islovay, en caso de arrojar resultado negativo se procedió a adicionar polvo de zinc.

4.5. Potencial biotecnológico

Este numeral consta de tres ensayos, el primero se enfocó en determinar si las cepas estudio tenían la capacidad de inhibir diferentes patógenos, el segundo ensayo consistió en determinar si producían pigmentos y el último ensayo análisis de extractos crudos por espectrofotometría.

4.5.3. Actividad antimicrobiana

Se realizó por el método de doble capa, para este ensayo se sembraron por punción las cepas de interés, se incubaron a 28 °C por 10 días, pasado este tiempo se añadió la segunda capa que consistía en caldo CASO suplementado con 0,7 % agar-agar y cada una de las cepas patógenos con una turbidez 1 McFarland, y se incubaron por 48 horas, observando los resultados a las 24 y 48 horas. Las cepas patógenas probadas fueron: ***Salmonella paratyphi*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella sonnei*, *Yersinia enterocolitica*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumani*, *Staphylococcus saprofiticus*, *Staphylococcus aureus*, *Providencia alcaligenes*, *Rhodococcus equi*** las cepas patógenas fueron escogidas con base a su patogenicidad. Este ensayo constó de una réplica biológica. La metodología usada fue adaptada a la usada por (Tarazona *et al.*, 2017). Los resultados positivos se midieron en milímetros (mm) y posteriormente se les aplicó la siguiente fórmula a los resultados positivos:

$$\text{Diametro de inhibicion} = Dh - Dc$$

Donde Dh es diámetro de halo de inhibición y Dc es diámetro de colonia.

4.5.4. Producción de pigmentos

Para la producción de pigmentos se realizó un proceso de fermentación, utilizando 1/5 de volumen de medio ISP4 en cada una de los erlenmeyer, los cuales fueron inoculados con una asada de cada una de las cepas de interés, posteriormente se llevaron al agitador orbital a 150 rpm, 22 °C, 15 días. Pasado el tiempo de incubación se observó la presencia de pigmentos.

4.5.5. Análisis de extractos crudos por espectrofotometría

Para este análisis las cepas se sometieron a un proceso de fermentación tal y como se indica en el numeral 4.2. de la metodología. Pasado el tiempo de incubación se tomó una alícuota de 2 ml de caldo de fermentación y se realizó un barrido en el espectrofotómetro Biomate 5 y el rango utilizado fue de 200 nm a 800 nm, el cual incluyó una fracción del espectro no visible (UV), el espectro visible, y una pequeña fracción del infrarrojo.

5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividad	Año 2017			Año 2018								Año 2019	
	Junio	Julio	Septiembre -noviembre	Enero	Febrero- marzo	Mayo	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero
Revisión bibliográfica													
Toma de muestras													
Procesamiento de muestras													
Preparación de material													
Aislamiento y purificación de cepas													
Conservación de cepas													
Caracterización fenotípica													
Producción de metabolitos secundarios													
Escritura de informe final													

6. RESULTADOS

6.1. TOMA DE MUESTRAS

Como se mencionó en la numeral 4.1 de la metodología las muestras se tomaron en 3 puntos diferentes, en la Imagen 3 se puede observar su ubicación en el mapa que muestra la carretera vía Pamplona-Chitagá, la distancia entre los 3 puntos es de 2,71 km.

Imagen 3: Mapa geográfico, georreferenciado



En el panel A se observan los tres sitios de muestreo georreferenciados enumerados de 1 a 3, y en el panel B se observan fotografías de cada uno de los sitios de muestreo. Cada número corresponde a un punto de muestreo. Fotografías tomadas por el autor, el mapa con las coordenadas ubicadas fue generado por Google Maps.

Los sitios de muestreo fueron escogidos con base a que esta especie es endémica de dichos puntos y no se observa crecimiento de ninguna otra planta, además de esto dichas zonas poseen un suelo de tipo arcilloso el cual se caracteriza por ser seco haciéndolo no apto para todo tipo de plantas, agregando que en las zonas intermedias entre los puntos no se observa la planta de interés.

Esta planta cumple un papel importante en la fijación de nitrógeno en suelos, tiene un valor nutricional alto, posee un porcentaje alto de proteínas, son ricas en compuestos como alcaloides, polifenoles y fitoesteroles, producen metabolitos secundarios bioactivos, toleran hábitats secos y pobres en nutrientes (Lee *et al.*, 2018), agregando que es una planta con alta frecuencia en los sitios de muestreo y no ha sido estudiada anteriormente, lo cual la hace interesante para ser estudiada.

Se enfocó el estudio a nódulos ya que el proceso de fijación de nitrógeno está íntimamente relacionado a nódulos, además los nódulos se forman gracias a una relación simbiótica entre plantas y bacterias, añadiendo que se ha demostrado que hay mayor diversidad de microorganismos en la raíz y nódulos que en la rizósfera. En la imagen 4 se observa un ejemplar del espécimen de *Lupinus* estudiado.

Imagen 4: *Lupinus sp*



A) Fotografía de *Lupinus sp* donde se observa desde las flores hasta la raíz con los nódulos. B) Se observan las semillas de *Lupinus sp*. C) Flor de la planta de *Lupinus sp*. D) Raíz principal con nódulos de *Lupinus sp*.

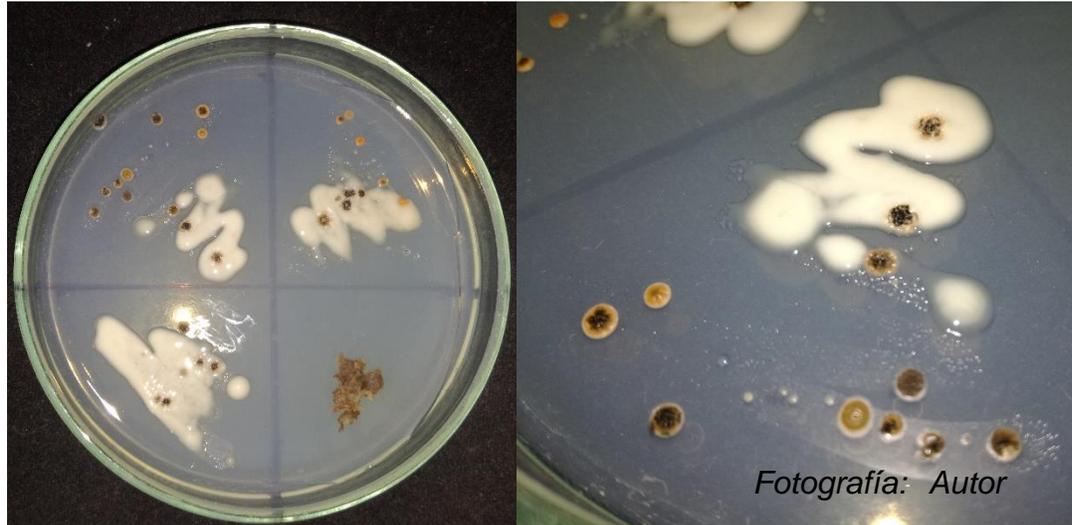
Para el aislamiento de las cepas no se usaron todos los nódulos obtenidos, se escogieron solo aquellos que presentaran una coloración rosada, la cual indica que el nódulo está activo y las bacterias que poseen están vivas.

6.2. AISLAMIENTOS DE CEPAS CULTIVABLES DE ACTINOBACTERIAS

Se aislaron un total de 53 cepas presuntivas de *Actinobacterias* de los nódulos, las cuales variaban desde colores naranjas, amarillos, grises hasta negras, todas fueron codificadas con A y un número del 1 al 54, en la Imagen cuatro se observa un aislamiento realizado en medio YMA después de un mes de incubación a 28 °C.

Del primer muestreo se logró obtener nueve cepas codificadas de A01 a A09, en el segundo muestreo se obtuvieron 11 cepas codificadas de A10 a A20, y del último muestreo se lograron aislar 33 cepas codificadas de A21 a A54.

Imagen 5: Aislamiento de *Actinobacterias* de nódulos de *Lupinus sp* en medio YMA



En la fotografía del panel A se observa un aislamiento de Actinobacterias de 1 mes de incubación en medio YMA, y en la fotografía del panel B se observa el acercamiento de un cuadrante del aislamiento donde se ven colonias típicas de Actinobacterias que varían de colores naranja-negro, naranja amarillento y marrón, además de esto se visualizan bacterias fijadoras de nitrógeno, las cuales son de color blanco y textura dura.

Las 53 cepas permanecen conservadas por congelación usando como crioconservante glicerol, en el grupo de investigación GIMBIO, bajo las condiciones de mencionadas en el numeral 4.2.

6.3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

6.3.1. Caracterización macroscópica.

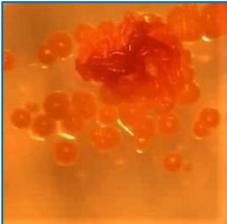
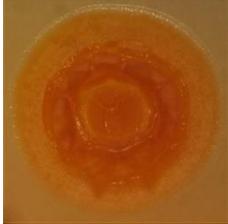
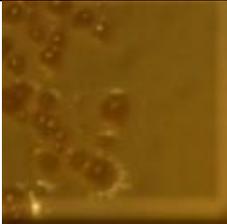
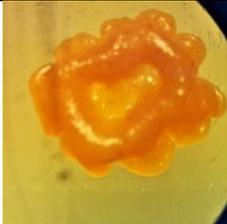
En la clasificación de Actinobacterias se suele recurrir a las características macroscópicas, como paso inicial, donde se tienen en cuenta y describen características como: forma, color, elevación, textura y producción de pigmentos difusibles, la importancia de estos rasgos recae en la gran diversidad morfológica presente en este filo, ya que se pueden observar colonias de colores que van desde tonos blancos, rosados, amarillos, naranjas, rojos, hasta violetas, verdes, grises y

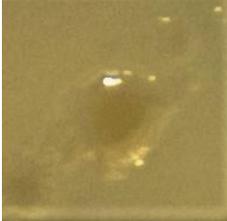
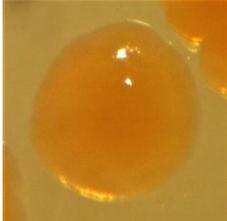
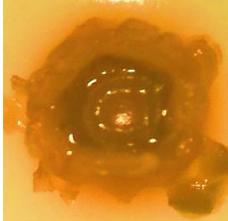
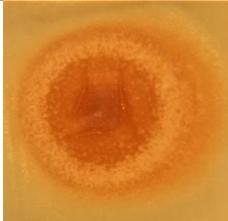
negras, también se observan colonias planas, elevadas, con filamentos, lisas y rugosas (Guevara, 2017; Hurtado *et al.*, 2018; Jose *et al.*, 2017; Revollo *et al.*, 2012).

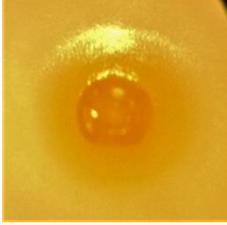
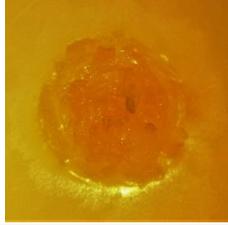
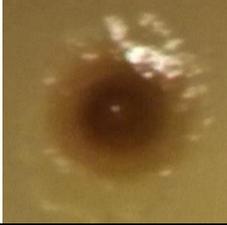
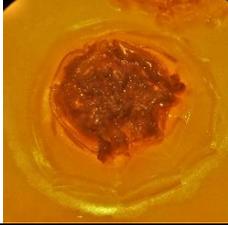
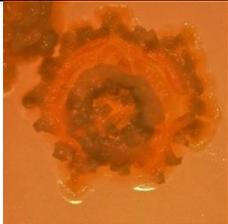
La caracterización de las cepas se realizó en 3 medios de cultivos diferentes los cuales fueron **ISP 1-M** (Tarazona *et al.*, 2017), **ISP2-M** (Harir *et al.*, 2017; Martínez *et al.*, 2017; Tarazona *et al.*, 2017) e **ISP4** (Harir *et al.*, 2017; Hurtado *et al.*, 2018; Tarazona *et al.*, 2017). Todas las cepas fueron incubadas a 28 °C ya que es la temperatura óptima de crecimiento para la mayoría de las *Actinobacterias*, el tiempo de incubación como se menciona en la metodología fue de 15 días (Ver anexo 1) debido a que muchas de ellas tienen crecimiento lento y otras con el tiempo cambian sus características morfológicas debido a los estados de conversión por los que pasan las hifas aéreas hasta llegar a la formación de esporas (León *et al.*, 2011). En este ensayo se pudo observar que las colonias de una misma cepa variaban sus características de un medio a otro (tabla 2), también se observó que las colonias generadas en el medio ISP1-M tendían a tener un diámetro menor que en los demás medios y en muchos casos las colonias perdían su pigmentación, en el medio ISP2-M varias cepas tendían a formar una agrupación de colonias que formaba filamentos y posteriormente si se observaban colonias aisladas generalmente con forma circular y convexa, y por último el medio ISP4 mostró ser un medio que promueve el crecimiento rápido de las cepas y la formación de esporas ya que se observaban colonias con masas negras o aspecto blanco polvoroso. También se observó la capacidad de algunas cepas para producir pigmentos extracelulares en algunos de los medios, en el caso del medio ISP1-M las cepas con capacidad de producir pigmento fueron A04, A24 y A39, para el medio ISP2-M, AO8, A14, A21, A23, A27, A36 y A49 y en el ISP4 modificado A15, A24, A27, A31, A36 y A39.

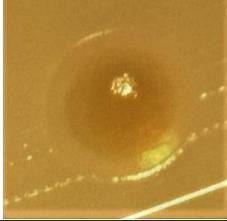
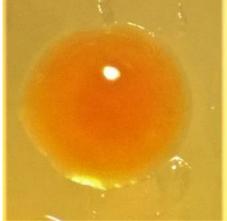
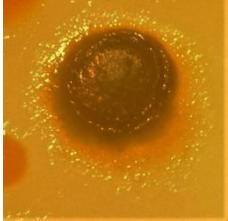
Tabla 2: Caracterización macroscópica de cepas aisladas de nódulos de *Lupinus sp*

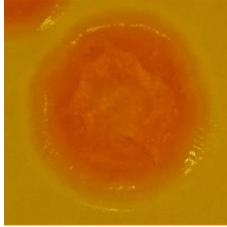
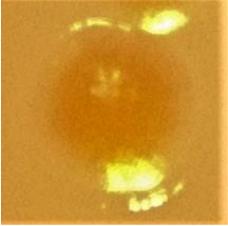
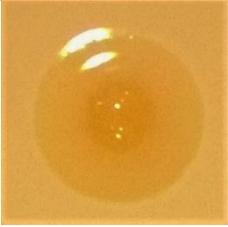
CEPA	ISP 1-M	ISP 2-M	ISP4
A01		NC	
	Diámetro: 0,34 mm Color naranja profundo, forma C, borde E, Elevación Conv,		Diámetro 1,35 mm Color rosa anaranjado amarillento con zonas blancas,

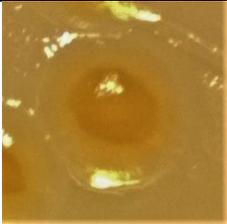
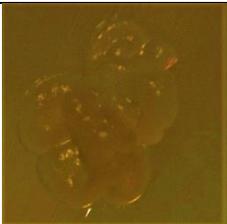
	Comportamiento a la luz T.		forma C, borde E, elevación Cr.
A02			
	Diámetro 0,50 mm Color amarillo naranja fuerte, forma P, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz T.	Diámetro 0,23 mm Color naranja fuerte zonas rojo intenso, forma C, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz O.	Diámetro 1,67 mm Color naranja vivo algunas con zonas blancas, forma C, borde E, elevación R.
A03			
	Diámetro 1,57 mm Color amarillo-naranja claro con centro marrón fuerte, forma C, borde E, elevación Umb, comportamiento a la luz O.	Diámetro 12,33 mm Color amarillo naranja brillante con filamentos amarillos anaranjado fuerte, forma I, borde E, elevación PFE, comportamiento a la luz BOCT.	Diámetro 1,91 mm Color amarillo anaranjado fuerte con superficie negra, forma I, borde E, elevación Cr.
A04			

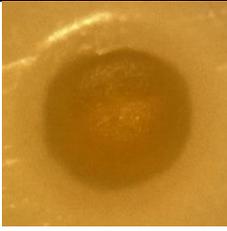
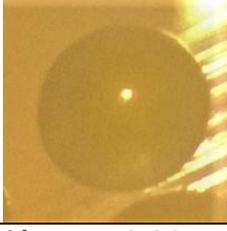
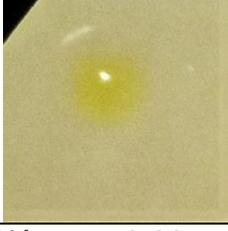
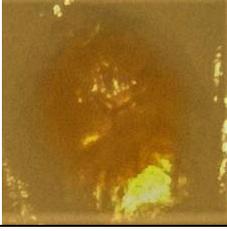
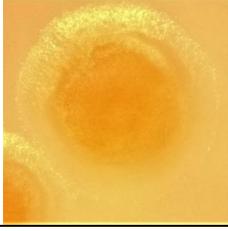
	Diámetro 0,29 mm Color marrón fuerte, forma P, borde E, elevación Conv, Comportamiento a la luz BTCO.	Diámetro 2,97 mm Color naranja vivo, forma I, borde E, elevación Cr, comportamiento a la luz O.	Diámetro 4,35 mm Color amarillo naranja intenso, forma I, borde E, elevación Elev.
A05			
	Diámetro 0,18 mm Comportamiento amarillo naranja brillante, forma P, borde E, elevación PI, comportamiento T.	Diámetro 0,99 mm Color naranja vivo, comportamiento C, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz O.	Diámetro 0,86 mm Color naranja intenso con centro marrón grisáceo oscuro, forma C, borde Ir, elevación Cra.
A06		NC	
	Diámetro 0,99 mm Amarillo anaranjado con centro marrón fuerte y borde blanco amarillento, C, E, Conv, COBT.		Diámetro 1,68 mm Moderadamente naranja con halo blanco, borde marrón oscuro y nuevamente blanco, C, E, Cr.
A07			
	Diámetro 0,53 mm Color amarillo naranja brillante,	Diámetro 7,72 mm Color naranja vivo con centro negro,	Diámetro 0,28 mm Color naranja moderado que vira

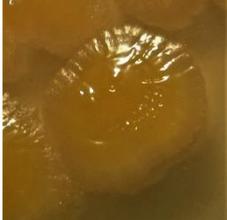
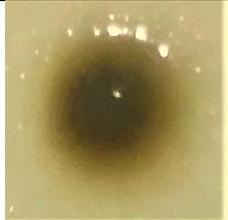
	forma P, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz T.	forma Ri, borde Rz, elevación Elev, comportamiento a la luz T.	a negra, forma C, borde E, elevación Pl.
A08			
	Diámetro 1,22 mm Color amarillo naranja fuerte con halo Blanco, forma C, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz O.	Diámetro 1,48 mm Color amarillo naranja brillante, forma I, borde E, elevación Zonas elevadas, comportamiento a la luz T.	Diámetro 0,26 mm Color naranja moderado con centro naranja-marrón, forma C, borde E.
A09			
	Diámetro 2,31 mm Color naranja moderado con centro marrón intenso, forma C, borde E, elevación R, comportamiento a la luz O.	Diámetro 0,41 mm Color amarillo naranja intenso con centro marrón amarillento fuerte, forma C, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz BT.	Diámetro 3,83 mm Color naranja moderado con centro rojo intenso, forma C, borde E.
A10			
	Diámetro 1,24 mm Color marrón intenso con halo	Diámetro 4,73 mm Color marrón intenso, forma F,	Diámetro 2,25 mm Color naranja rojizo moderado

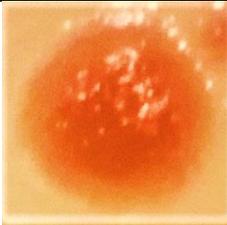
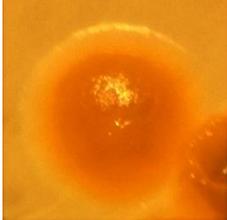
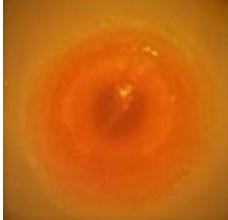
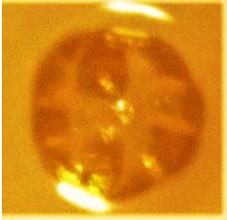
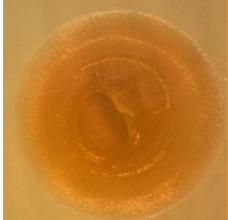
	naranja moderado, forma l, borde Ond, elevación Cr, comportamiento a la luz O.	borde E, comportamiento a la luz O.	con bordes negro pardo, forma C, borde L, elevación Cr.
A11			
	Diámetro 0,9 mm Color amarillo claro, forma C, borde E, elevación Elev, comportamiento a la luz O.	Diámetro 0,56 mm Color naranja vivo, forma C, borde E, elevación Elev, comportamiento a la luz O.	Diámetro 0,70 mm Colonias negras con blanco, forma C, borde E, elevación Cr.
A12			
	Diámetro 0,55 mm Color oliva claro, forma C, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz T.	Diámetro 1,31 mm Color naranja moderado, forma C, borde E, elevación R, comportamiento a la luz O.	Diámetro 2,04 mm Color naranja vivo superficie negra, forma C, borde E, elevación Cr.
A13			
	Diámetro 0,54 mm Color amarillo naranja intenso, forma C, borde E, elevación Conv,	Diámetro 0,82 mm Color rosa vivo amarillento, forma C, borde E, elevación Conv,	Diámetro 1,18 mm Color rosa vivo amarillento con superficie negra,

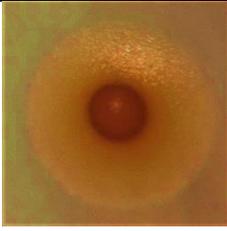
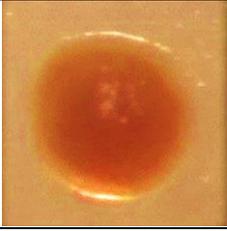
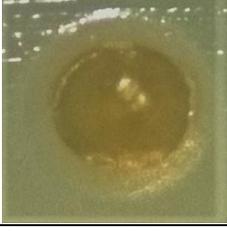
	comportamiento a la luz T.	comportamiento a la luz T.	forma C, borde E, elevación Elev.
A14			
	Diámetro 0,68 mm Color naranja rojizo intenso, forma C, borde E, elevación Elev, comportamiento a la luz O.	Diámetro 9,51 mm Color rosa vivo amarillento, forma F, borde E, elevación EF, comportamiento a la luz O.	Diámetro 1,34 mm Color naranja vivo, forma C, borde E, elevación Elev.
A15			
	Diámetro 0,30 mm Color amarillo fuerte, forma P, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz T.	Diámetro 7,42 mm Color marrón fuerte, forma F, borde E, elevación PB, comportamiento a la luz BOCT.	Diámetro 1,34 mm Naranja intenso con centro marrón fuerte, C, E, A.
A16			
	Diámetro 0,57 mm Color naranja claro, forma C, borde E, elevación R, comportamiento a la luz T.	Color naranja vivo, elevación E, comportamiento a la luz BT.	Diámetro 1,53 mm Color naranja rojizo fuerte, forma C, borde E, forma Cr.

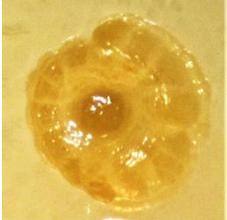
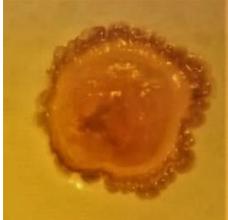
A17			
	Diámetro 2,00 mm Color naranja claro con centro naranja intenso, forma C, borde E, elevación R, comportamiento a la luz BTCO.	Diámetro 10,98 mm Color naranja moderado, forma F, borde E, elevación PFE, comportamiento a la luz O.	Diámetro 1,37 mm Color naranja moderado centro marrón oscuro, forma C, borde E, elevación Cr.
A18-1			
	Diámetro 0,49 mm Color amarillo anaranjado fuerte, forma C, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz T.	Diámetro 3,38 mm Color naranja vivo superficie negra, forma I, borde E, elevación EF, comportamiento a la luz O.	Diámetro 1,38 mm Color naranja vivo superficie negra, forma C, borde E, elevación Cr.
A19			
	Diámetro 0,81 mm Color blanco verdosa, forma I, borde E, elevación Elev, comportamiento a la luz BTCO.	Diámetro 2,64 mm Color amarillo grisáceo centro amarillo pálido con zonas blancas, forma I, borde E, elevación Elev, comportamiento a la luz O.	Diámetro 3,10 mm Color amarillo verdoso con halo Blanco, forma C, borde E, elevación R.

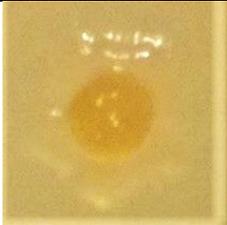
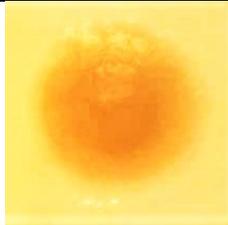
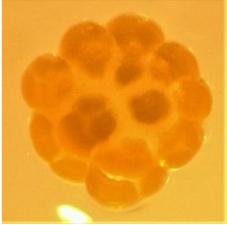
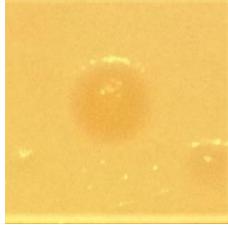
A20			
	Diámetro 0,50 mm Color amarillo naranja intenso, forma C, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz O.	Color naranja moderado con zonas negras, Elevación PFE, comportamiento a la luz T.	Diámetro 1,35 mm Color naranja vivo, forma C, borde E, elevación Cr.
A21			
	Diámetro 0,38 mm Color amarillo verdoso vivo, forma P, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz T.	Diámetro 1,58 mm Color amarillo intenso, forma C, borde E, elevación Elev, comportamiento a la luz T.	Diámetro 0,28 mm Color amarillo verdoso vivo, forma P, borde E, elevación Conv.
A22			
	Diámetro 0,39 mm Color moderadamente naranja, forma C, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz T.	Diámetro 0,58 mm Color naranja vivo zonas naranja rojizas oscuras, forma C, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz T.	Diámetro 1,33 mm Color moderadamente naranja, forma C, borde E, elevación Elev.

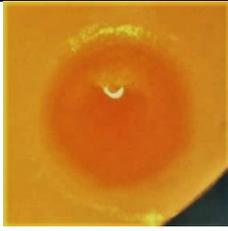
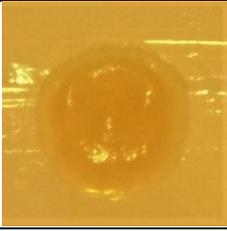
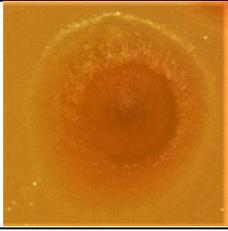
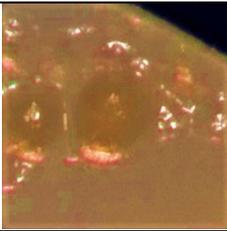
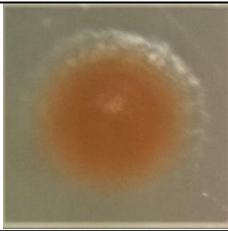
A23			
	Diámetro 0,49 mm Color amarillo verdoso, forma C, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz T.	Diámetro 3,02 mm Color amarillo vivo, forma C, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz T.	Diámetro 0,43 mm Color amarillo verdoso, forma C, borde E, elevación Conv.
A24			
	Diámetro 1,25 mm Color amarillo anaranjado pálido, forma I, borde E, elevación Elev, comportamiento a la luz O.	Diámetro 3,64 mm Color amarillo claro, forma C, borde D, elevación Pu, comportamiento a la luz O.	Diámetro 1,43 mm Color amarillo claro, forma I, borde E, elevación Elev.
A25		NC	
	Diámetro 0,49 mm Color naranja intenso, forma C, borde E, elevación R, comportamiento a la luz T.		Diámetro 0,46 mm Color marrón oliva claro con centro marrón oliva moderado, forma P, borde E, elevación R.

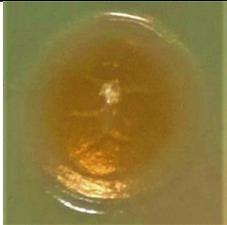
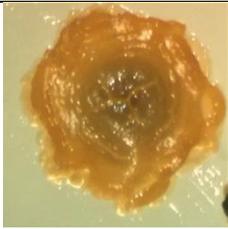
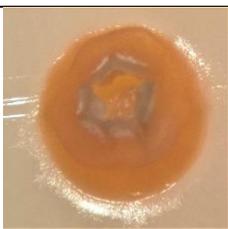
A26			
	Diámetro 0,47 mm Color naranja rojizo intenso, forma C, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz BTCO	Diámetro 1,50 mm Color naranja vivo, forma I, borde RZ, elevación E, comportamiento a la luz T.	Diámetro 0,92 mm Color amarillo anaranjado claro, forma P, borde E, elevación R.
A27			
	Diámetro 0,41 mm Color moderadamente naranja, forma C, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz O.	Diámetro 0,6 mm Color naranja vivo con centro naranja rojizo vivo, forma C, borde E, elevación R, comportamiento a la luz T.	Diámetro 0,29 mm Color naranja claro, forma C, borde E, elevación R.
A28			
	Diámetro 0,51 Color naranja intenso, forma C, borde E, elevación Conv, T.	Diámetro C 0,53 mm Color naranja vivo, forma C, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz O.	Diámetro 1,52 mm Color naranja vivo algunas colonia superficie negra, forma C, borde E, elevación R.

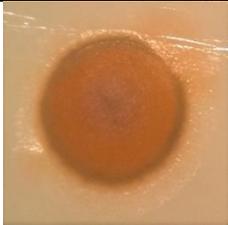
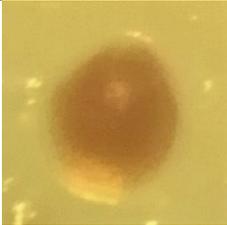
A29			
	Diámetro 0,96 mm Color amarillo naranja brillante con centro marrón rojizo fuerte, forma C, borde E, elevación R, comportamiento a la luz T.	Diámetro 2,45 mm Color naranja vivo, forma I, borde E, elevación Elev, comportamiento a la luz O.	Diámetro 1,18 mm Color rosa vivo amarillento, forma C, borde E, elevación Elev.
A30			
	Diámetro 0,45 mm Color naranja intenso, forma C, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz O.	Diámetro 0,85 mm Color naranja rojizo fuerte halo blanco, forma C, borde Fi, elevación Conv, comportamiento a la luz O.	Diámetro 1,06 mm Color naranja rojizo fuerte con zonas blancas, forma C, borde E, elevación R.
A31			
	Diámetro 0,37 mm Color amarillo naranja moderado, forma C, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz T.	Diámetro 4,90 mm Color moderadamente naranja, forma F, borde E, elevación PFE, comportamiento a la luz O.	Diámetro 1,17 mm Color naranja profundo, forma C, borde E, elevación R.

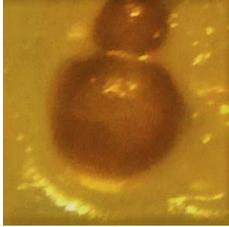
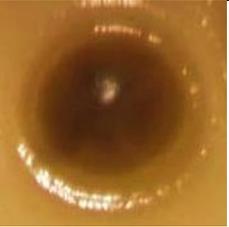
A32			
	Diámetro 0,64 mm Color amarillo naranja claro, forma C, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz T.	Diámetro 0,53 mm Color naranja fuerte, forma C, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz O.	Diámetro 1,22 mm Color naranja claro con zonas negras y blancas, forma C, borde E, elevación Conv.
A33			
	Diámetro 1,18 mm Color moderadamente naranja, forma C, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz O.	Diámetro 4,53 mm Color rosa amarillento vivo, forma F, borde E, elevación EF, comportamiento a la luz O.	Diámetro 1,61 mm Color moderadamente naranja, forma I, borde Ond, elevación R.
A35			
	Diámetro 0,38 mm Color amarillo pálido, forma P, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz T.	Diámetro 7,88 mm Color naranja claro, forma I, borde E, elevación EF, comportamiento a la luz O.	Color anaranjado fuerte con superficie negra, bordes Ond.

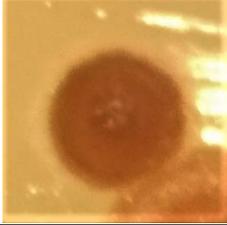
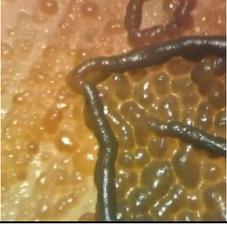
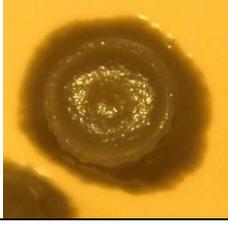
A36			
	Diámetro 0,87 mm Color amarillo pálido centro moderadamente marrón oliva, forma C, borde FI, elevación Conv, comportamiento a la luz O.	Diámetro 0,39 mm Color amarillo anaranjado claro con halo blanco, forma C, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz T.	Diámetro 0,85 mm Color naranja profundo, forma C, borde E, elevación R.
A37			
	Diámetro 0,99 mm Color moderadamente naranja con zonas naranja claro, forma I, borde E, elevación Elev, comportamiento a la luz O.	Diámetro 2,36 mm Color naranja claro, forma I, borde E, elevación Elev, comportamiento a la luz BTCO.	Diámetro 0,26 mm Color amarillo anaranjado fuerte, forma P, borde E, elevación conv.
A38			
	Diámetro 0,27 mm Color naranja rojizo fuerte, forma P, borde E, elevación Cra, comportamiento a la luz O.	Diámetro 1,91 mm Color moderadamente naranja, forma C, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz BTCO.	Diámetro 0,55 mm Color naranja moderado con zonas marrones, forma C, borde E, elevación Conv.

A39			
	Diámetro 0,43 mm Color amarillo pálido, forma P, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz T.	Diámetro 0,44 mm Color moderadamente naranja, forma C, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz O.	Diámetro 1,51 mm Color naranja parduzco, forma C, borde E, elevación Conv.
A40			
	Diámetro 0,47 mm Color, amarillo naranja brillante, forma C, borde E, elevación E, comportamiento a la luz O.	Diámetro 0,29 mm Color naranja vivo, forma C, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz O.	Diámetro 0,77 mm Color amarillo anaranjado claro con centro Amarillo anaranjado intenso, forma C, borde E, elevación R.
A41			
	Diámetro 0,27 mm Color amarillo naranja moderado, forma P, borde E, Conv, comportamiento a la luz T.	Diámetro 0,41 mm Color naranja vivo, forma C, borde E, elevación Elev, comportamiento a la luz O.	Diámetro 0,73 mm Color moderadamente naranja con halo blanco, forma C, borde E, elevación Conv.

<p>A42</p>			
	<p>Diámetro 0,50 mm Color amarillo anaranjado fuerte, forma C, borde E, Conv, comportamiento a la luz BTCO.</p>	<p>Diámetro 0,64 mm Color naranja rojizo fuerte, forma C, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz O.</p>	<p>Diámetro 1,58 Color rosa amarillento vivo, forma C, borde E, elevación Conv.</p>
<p>A43</p>			
	<p>Diámetro 0,27 mm Color amarillo naranja brillante, forma P, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz T.</p>	<p>Diámetro 0,80 mm Color rosa amarillento vivo, forma C, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz O.</p>	<p>Diámetro 1,34 mm Color naranja vivo centro negro, forma C, borde E, elevación Elev.</p>
<p>A44</p>			
	<p>Diámetro 0,37 mm Color amarillo anaranjado intenso, forma P, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz T.</p>	<p>Diámetro 4,32 mm Color moderadamente naranja con centro negro, forma F, borde E, elevación EF, comportamiento a la luz O.</p>	<p>Diámetro 1,44 mm Color naranja profundo, forma C, borde E, elevación Cra.</p>

A45			
	Diámetro 0,52 mm Moderadamente naranja, forma P, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz T.	Diámetro 10,03 mm Naranja profundo, forma C, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz O.	Diámetro 1,05 mm Moderadamente naranja, forma C, borde E, elevación Conv.
A46			
	Diámetro 0,64 mm Color amarillo anaranjado fuerte, forma C, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz T.	Diámetro 1,78 mm Color moderadamente naranja superficie negra, forma I, borde E, elevación EF, comportamiento a la luz O.	Diámetro 0,82 mm Color moderadamente naranja con centro marrón intenso, forma C, borde E, elevación R.
A47			
	Diámetro 0,37 mm Color marrón oliva claro con halo blanco, forma C, borde E, elevación Conv,	Color naranja moderado con superficie negra, borde entero, opaca.	Diámetro 1,49 mm Color naranja profundo centro negro pardo, forma C, borde F, elevación Umb.

	comportamiento a la luz O.		
A48			
	Diámetro 0,40 mm Color marrón claro, forma C, borde E, elevación Conv, comportamiento en O.	Diámetro 0,37 mm Color marrón intenso, forma P, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz BTCO.	Diámetro 0,81 mm Color moderadamente naranja con centro negro pardo, forma C, borde E, elevación Conv.
A49			
	Diámetro 2,55 mm Color amarillo pálido con centro moderadamente amarillo anaranjado, forma C, borde E, elevación Umb, comportamiento a la luz BTCO.	Diámetro 1,45 mm Color naranja claro, forma I, borde E, elevación Fil, comportamiento a la luz T.	Diámetro 0,29 mm Color amarillo anaranjado pálido con centro marrón rojizo profundo, forma C, borde E, elevación Conv.
A50			

	<p>Diámetro 2,76 mm Color amarillo pálido con centro marrón fuerte, y partes marrones rojizas, forma C, borde E, elevación R, comportamiento a la luz O.</p>	<p>Diámetro 0,66 mm Color marrón oscuro, forma C, borde E, elevación Elev, comportamiento a la luz T.</p>	<p>Diámetro 0,40 mm Color negro, forma C, borde D, elevación Elev.</p>
A51			
	<p>Diámetro 0,50 mm Color amarillo claro, forma C, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz T.</p>	<p>Diámetro 0,40 mm Color moderadamente naranja, forma P, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz O.</p>	<p>Diámetro 1,60 mm Color amarillo anaranjado fuerte con zonas blancas y centro negro, forma C, borde E, elevación Cr.</p>
A52			
	<p>Diámetro 0,32 mm Color blanca amarillenta, forma P, E, elevación Conv, comportamiento a la luz T.</p>	<p>Diámetro CA 0,39 mm Color naranja moderado, forma P, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz T.</p>	<p>Diámetro 1,41 mm Color moderadamente naranja con superficie negra y zonas blancas, forma I, borde E, elevación Cr.</p>
A53			

	Diámetro 1,81 mm Color amarillo naranja brillante con centro amarillo naranja claro, forma C, borde E, elevación PI, comportamiento a la luz O.	Diámetro 0,15 mm Color naranja moderado, forma P, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz T.	Diámetro 0,63 mm Colonias negras, forma C, borde E, elevación E.
A54	Nd		Nd
		Diámetro 0,16 mm Color amarillo naranja fuerte, forma P, borde E, elevación Conv, comportamiento a la luz T.	

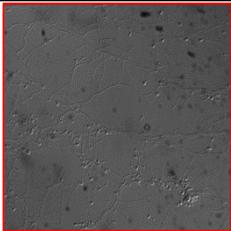
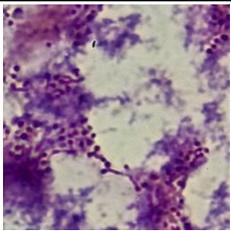
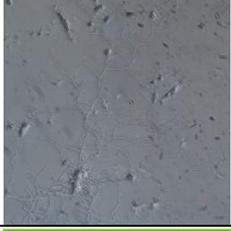
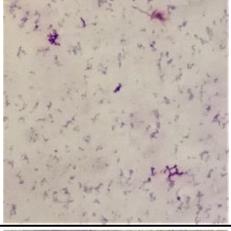
Las fotografías observadas en las columnas fueron tomadas en el estereoscopio con un aumento de 32x, las fotografías que tienen un marco de color azul fueron tomadas en el estereoscopio en un aumento de 8x, en la parte inferior de cada fotografía encontramos una leyenda de la morfología de cada colonia usando las siguientes abreviaturas: **NC**: no creció; **Forma**: C: circular, I: irregular, P: puntiforme, Ri: rizoide; **Borde**: D: dentada, E: entero, EF: filamentos elevados, Fi: filamentoso, Ir: irregular, Ond: ondulado, Rz: rizoide; **Elevación**: Conv: convexo, Cr: crateriforme, Elev: elevado, Fil: filamentosa, Pl: plana, PB: plana bordes elevados, PFE: plana filamentos elevados, PU: pulvinada, R: elevada borde extendido, Umb: umbonada; **Comportamiento a la luz**: BTCO: bordes translucidos centro opaco, O: opaco, T: translucido. Las cepas con un marco de color rojo son aquellas que fueron sembradas por punción.

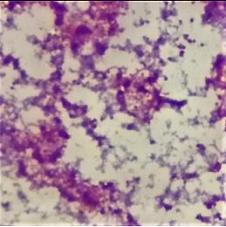
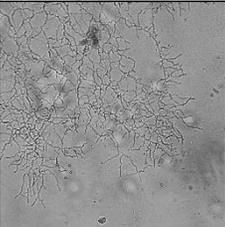
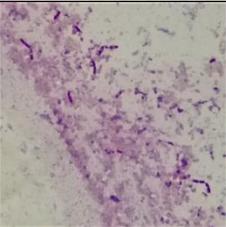
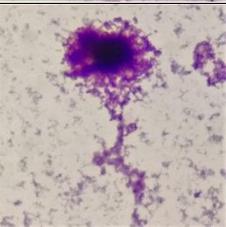
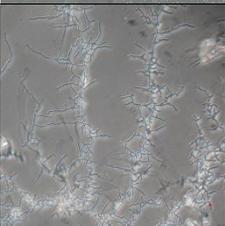
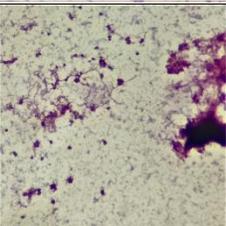
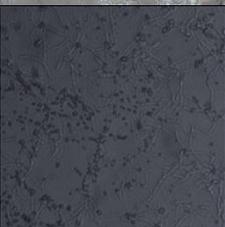
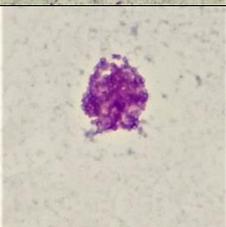
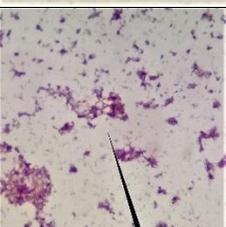
A partir de la tabla anterior se observa que las cepas A01, A06 y A25, no crecieron en el medio ISP2-M, agregando que la cepa A31 en el medio ISP2-M no mostró crecimiento a los siete días pero si a los 15 días (datos en anexos). Sugiriendo que dicho medio es el medio menos apto para el crecimiento de las cepas estudiadas.

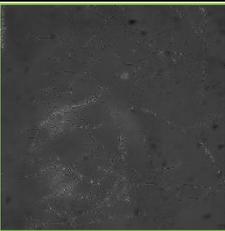
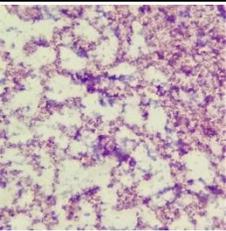
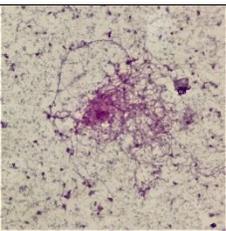
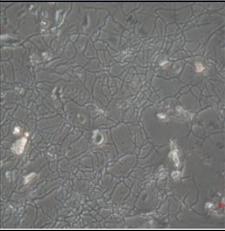
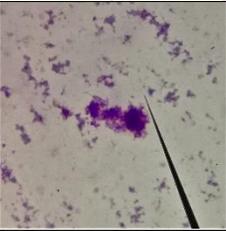
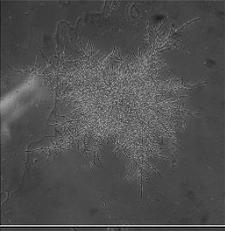
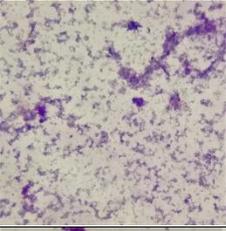
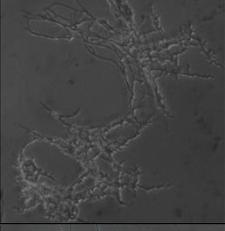
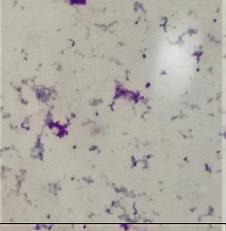
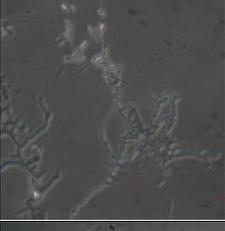
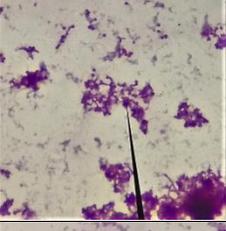
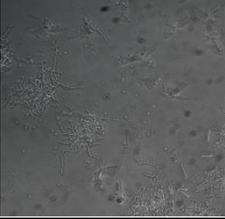
6.3.2. Micromorfología. Otro criterio taxonómico para la identificación de Actinobacterias es la microscopía, generalmente se suelen buscar estructuras como hifas, organización de esporas, estructura del esporóforo, y estructuras de esporulación (Harir *et al.*, 2017; Hurtado *et al.*, 2018; Revollo *et al.*, 2012).

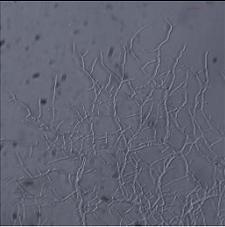
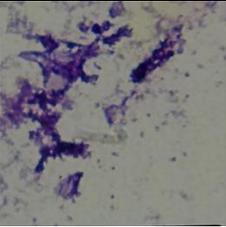
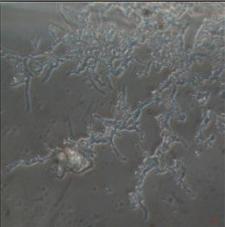
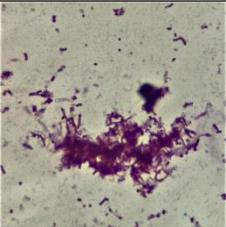
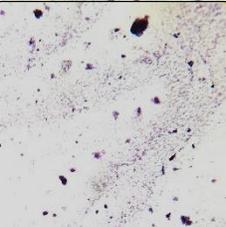
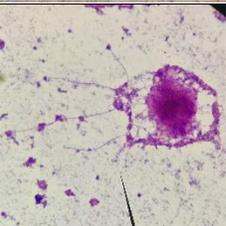
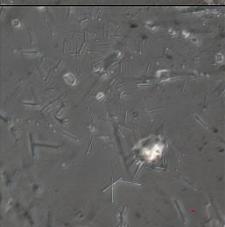
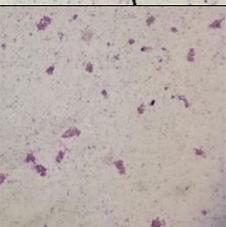
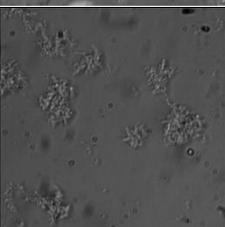
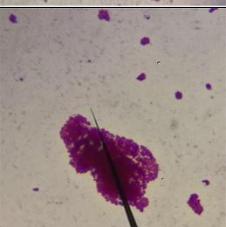
Para determinar la micromorfología de las cepas de estudio se observaron en el microscopio de contraste, lográndose observar diversas estructuras microscópicas (Tabla 3), como zonas de hifas con esporas solas entre las cuales encontramos la A04, A11, A39; hifas con esporóforos y esporas como fue el caso de la cepas A01, A03, A09, A28, A 36, A37, A46; esporangios germinados con hifas ramificadas A26, A33, A36, A38 A42 y A52; hifas ramificadas A05, A07, A08, A09, A15, A16, A18, A20, A24, A27, A29, A30, A31, A32; hifas con cuerpos globosos A51, A40, A07 e hifas fragmentadas A13, A17, A19, A33 y A46.

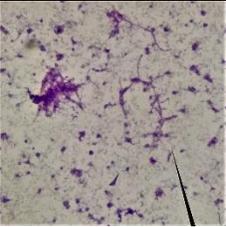
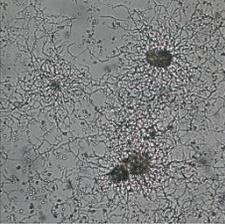
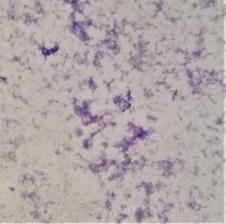
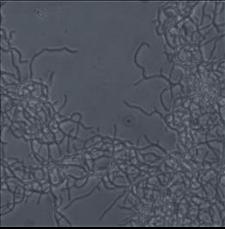
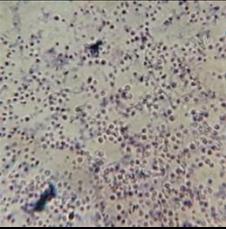
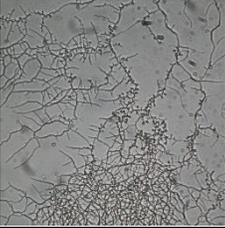
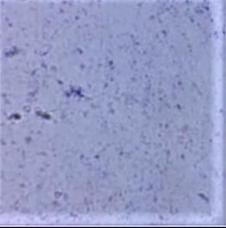
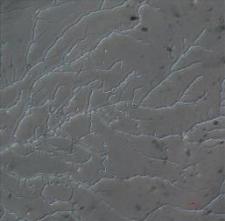
Tabla 3: Micromorfología de las cepas aisladas

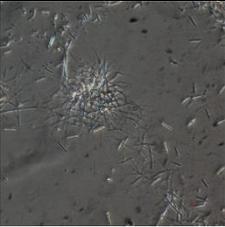
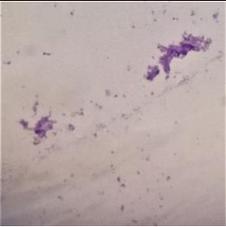
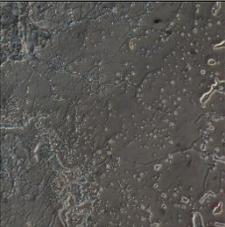
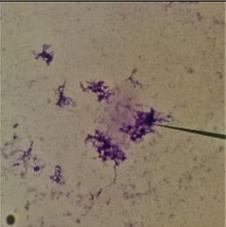
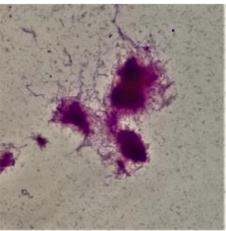
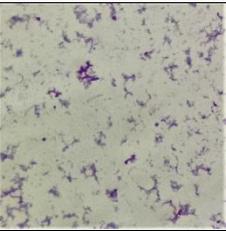
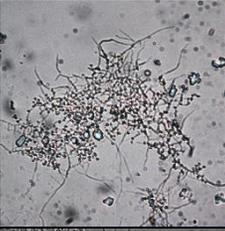
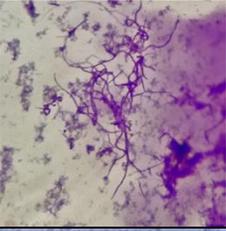
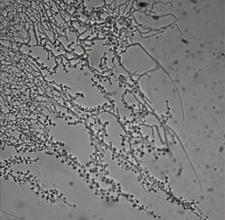
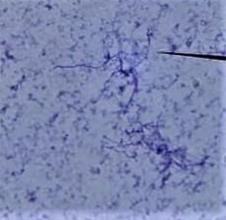
CEPA	Estructuras observadas	MICROCULTIVO	TINCIÓN DE GRAM
A01	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Esporóforos ✓ Esporas ✓ Fragmentos 		
A02	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Esporangios germinados desarrollando micelio ✓ Hifas ramificadas 		
A03	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas con esporas 		

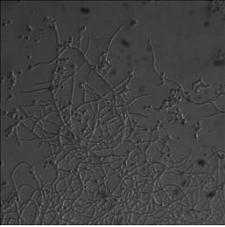
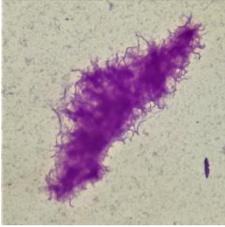
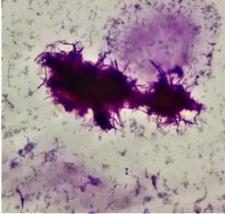
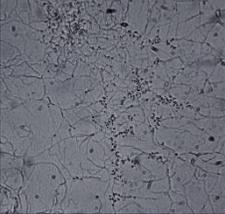
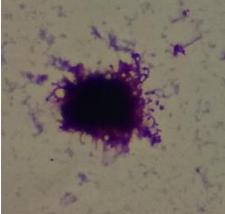
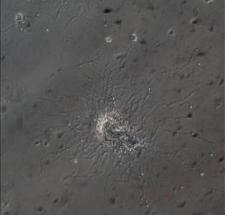
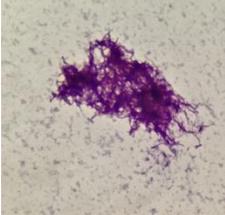
A04	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Esporas 		
A05	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas 		
A06	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Esporas solas 		
A07	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Esporas solas ✓ Hifas con esporóforos 		
A08	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas 		
A09	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Esporas ✓ Fragmentos bacilares 		
A10	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Fragmentos en forma de varilla 		

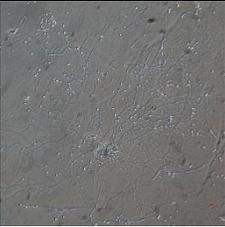
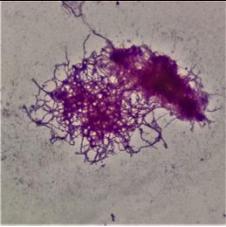
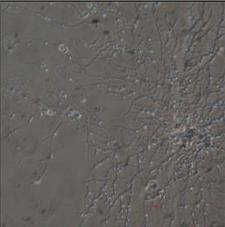
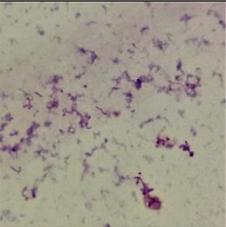
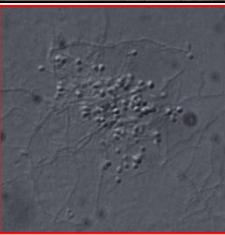
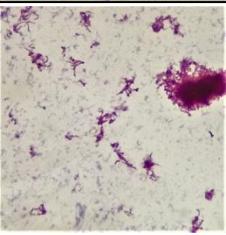
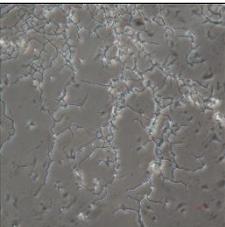
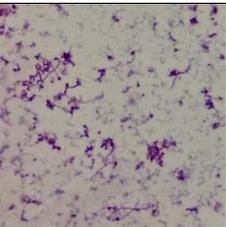
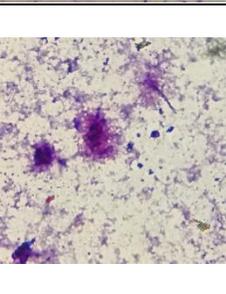
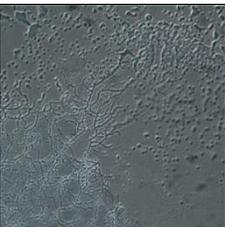
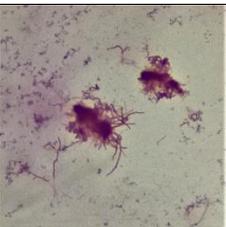
A11	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Esporas 		
A12	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ✓ Fragmentos en forma de varilla 		
A13	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Fragmentos en forma de varilla 		
A14	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Fragmentos en forma de varilla 		
A15	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Fragmentos en forma de varilla ✓ Esporas 		
A16	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas 		
A17	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Esporas ✓ Fragmentos en forma de varilla 		

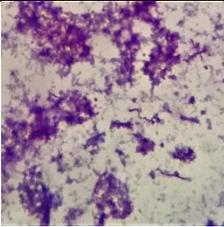
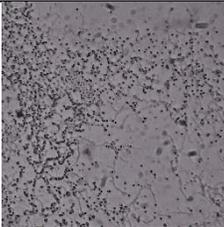
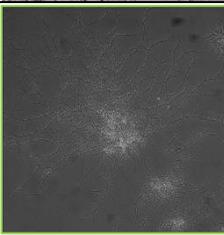
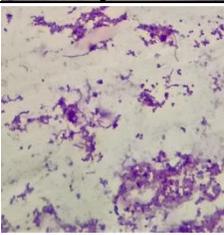
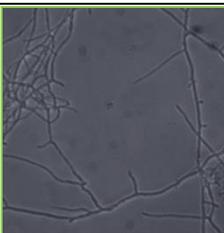
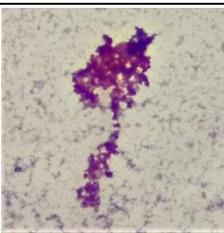
A18	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas 		
A19	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Esporas ✓ Fragmentos 		
A20	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Esporas ✓ Fragmentos 		
A21	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Cocos 		
A22	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Fragmentos en forma de varilla ✓ Esporas 		
A23	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Formas de varilla y cocos 		
A24	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Esporas en cadenas ✓ Micelio que parece un esporangio 		

A25	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Fragmentos en forma de varilla 		
A26	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Esporangios germinados desarrollando micelio ✓ Hifas ramificadas ✓ Esporas en grupos ✓ Cuerpos globosos 		
A27	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Esporas 		
A28	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Esporóforos con esporas 		
A29	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Esporas 		
A30	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Fragmentos en forma de varilla 		

A31	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Fragmentos en forma de varilla 		
A32	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Fragmentos en forma de varilla ✓ Esporas 		
A33	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Fragmentos en forma de varilla ✓ Esporas ✓ Esporangios germinados desarrollando nuevo micelio 		
A35	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Fragmentos en forma de varilla 		
A36	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Esporas sobre el micelio ✓ Esporóforo 		
A37	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas con esporóforos con espora 		

A38	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Esporangio germinado desarrollando nuevo micelio ✓ Hifas con esporas 		
A39	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Fragmentos en forma de micelio ✓ Esporas 		
A40	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Fragmentos en forma de varilla ✓ Cuerpos globosos 		
A41	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Esporas en cadenas ✓ Micelio que parece un esporangio 		
A42	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Esporangios germinados desarrollando nuevo micelio 		
A43	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Fragmentos en forma de varilla esporas 		

A44	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Esporas 		
A45	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Esporas 		
A46	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Esporóforos con esporas 		
A47	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Fragmentos en forma de varilla ✓ Esporas 		
A48	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Esporangio germinado desarrollando micelio ✓ Fragmentos en formas de hifas 		
A49	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Cuerpos globosos 		

A50		Nd	
A51	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Cuerpos globosos 		
A52	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Esporangios germinados desarrollando micelio 		
A53	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hifas ramificadas ✓ Fragmentos en forma de varilla ✓ Esporóforos 		

La tabla se encuentra dividida en 4 columnas, la columna A hace referencia al código de cada cepa, la columna B indica las diferentes estructuras que se observaron, la columna C contiene una fotografía de cada cepa tomada con el microscopio de contraste con un aumento de 20x (marco verde), 40X y de 100X (marco rojo), en la columna D se observan fotografías de la tinción de GRAM todas con un aumento de 100X.

6.4. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

6.4.1. Utilización de fuentes de carbono. En cuanto a la utilización de fuentes de carbono las cepas aisladas mostraron una gran capacidad para utilizar una amplia diversidad de sustratos, entre los que encontramos aldosas de 5 carbonos: ribosa, xilosa, arabinosa; aldosas de 6 carbonos: glucosa, galactosa, manosa, rhamnosa; cetonas de 6 carbonos: fructosa; disacáridos: sacarosa, maltosa, lactosa; alcoholes: glicerol, manitol y sorbitol; sustratos orgánicos: inositol; sales: acetato de sodio y citrato de sodio, como se observa en la tabla. En cuanto a la utilización de uno u otro grupo de compuestos no se observó preferencia por ninguno, siendo el citrato de sodio el compuesto más utilizado con un 63,26 % de cepas y el menos utilizado

el manitol con un total de 11,32 % de cepas. En cuanto a la cepa que utilizó un rango más amplio de compuestos fue la cepa A50 utilizando 13 de los 17 compuestos analizados, mientras que las cepas A26, A39 y A41 solo utilizaron una fuente de carbono. Datos mostrados en la tabla 4.

Tabla 4: Utilización de fuentes de carbono

Cepa	de Acetato sodio	de Citrato sodio	D-fructosa	D-galactosa	D-glucosa	D-manitol	D-manosa	D-ribosa	D-xilosa	Glicerol	Inositol	Lactosa	L-arabinosa	L-rharnosa	Maltosa	Sacarosa	Sorbitol
A01	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
A02	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
A03	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
A04	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
A05	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
A06	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
A07	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
A08	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
A09	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
A10	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-
A11	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
A12	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
A13	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+
A14	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
A15	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
A16	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	nd
A17	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
A18	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
A19	nd	nd	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	nd
A20	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
A21	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
A22	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
A23	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-
A24	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-
A25	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
A26	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A27	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-

Cepa	Acetato de sodio	Citrato de sodio	D-fructosa	D-galactosa	D-glucosa	D-manitol	D-manosa	D-ribosa	D-xilosa	Glicerol	Inositol	Lactosa	L-arabinosa	L-rhamnosa	Maltosa	Sacarosa	Sorbitol
A28	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-
A29	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
A30	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+
A31	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
A32	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
A33	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
A35	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
A36	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
A37	-	+	-	+	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	-
A38	+	+	-	+	-	-	-	nd	-	-	-	+	-	-	-	-	-
A39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
A40	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
A41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
A42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
A43	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+
A44	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
A45	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
A46	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+
A47	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
A48	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
A49	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
A50	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
A51	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+
A52	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
A53	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+
A54	nd	nd	-	+	-	-	+	-	nd	+	+	-	-	+	-	-	nd

Se presenta la capacidad de las cepas para utilizar diferentes fuentes de carbono, dicha actividad se reportó como: positivo (+), negativo (-), no determinada (nd).

Las fuentes de carbono más usadas fueron: Citrato de sodio 62,26%, galactosa 54,72%, lactosa 52,83%, glicerol 50,94%. En cuanto al resto de fuentes de carbono fueron usadas por menos del 50% de cepas, siendo la xilosa usada por 43,40%, maltosa 39,62%, D-manosa 35,85%, sorbitol 30,19%, inositol, acetato de sodio y sacarosa por el 28,30%, arabinosa 22,64%, L-rhamnosa 18,87%, ribosa 15,17%, D-fructosa 13,21% y manitol 11,32%.

6.4.2. **Producción de ácido.** A todas las cepas se le midió su capacidad de producir ácido a partir de ocho fuentes de carbono, observándose que muchas cepas eran ácido lento, ya que después de un mes de incubación estas hasta ahora estaban virando a amarillo, mientras que en otras la reacción positiva se observa perfectamente al mes, estos resultados los encontramos en la tabla 5.

Tabla 5: Producción de ácido a partir de diferentes fuentes de carbono

CEPA	D-glucosa	D-manitol	D-manosa	D-xilosa	Glicerol	Lactosa	Maltosa	Sacarosa
A01	+	+	-	-	-	L(+)	-	+
A02	L(+)	-	+	+	L(+)	L(+)	L(+)	+
A03	+	-	-	+	-	+	-	+
A04	-	-	-	-	-	L(+)	-	-
A05	+	-	+	-	+	+	L(+)	L(+)
A06	L(+)	-	+	-	L(+)	+	-	+
A07	+	-	L+	-	-	L(+)	-	L(+)
A08	+	-	+	+	-	+	-	+
A09	+	+	+	+	-	+	-	+
A10	L(+)	-	+	-	-	-	-	-
A11	+	-	+	-	-	+	-	+
A12	-	-	L+	-	-	L(+)	L(+)	-
A13	-	-	L+	-	-	+	L(+)	L(+)
A14	L(+)	L(+)	+	-	-	-	-	-
A15	-	L(+)	L+	-	-	-	-	-
A16	-	L(+)	-	+	-	-	-	-
A17	L(+)	-	L+	-	-	-	L(+)	-
A18	-	-	-	+	+	-	L(+)	-
A19	+	+	+	-	+	-	-	-
A20	-	-	+	L(+)	-	-	-	-
A21	-	-	+	-	-	-	-	-
A22	-	-	-	+	L(+)	-	-	-
A23	-	-	-	-	+	-	-	-
A24	-	L(+)	-	-	-	-	+	-
A25	-	-	+	-	-	-	-	-
A26	-	-	-	-	-	-	-	-

CEPA	D-glucosa	D-manitol	D-manosa	D-xilosa	Glicerol	Lactosa	Maltosa	Sacarosa
A27	-	-	L+	-	+	-	-	-
A28	-	+	-	L(+)	-	-	-	L(+)
A29	+	L(+)	+	+	L(+)	-	+	+
A30	+	-	+	+	-	+	-	L(+)
A31	L(+)	+	+	-	-	-	-	-
A32	L(+)	+	+	+	-	L(+)	-	+
A33	-	-	+	+	+	-	L(+)	+
A35	-	L+	-	L(+)	-	-	-	-
A36	-	-	+	-	-	-	-	-
A37	-	-	+	-	-	-	-	-
A38	-	-	-	-	-	-	-	-
A39	-	-	+	+	-	-	-	-
A40	+	-	L+	+	-	-	-	L(+)
A41	-	-	L+	-	-	-	-	-
A42	+	+	+	+	-	+	-	L(+)
A43	-	-	-	L(+)	-	-	L(+)	L(+)
A44	L(+)	-	+	-	-	-	-	-
A45	-	-	L+	+	-	-	-	L(+)
A46	L(+)	+	-	+	-	-	-	L(+)
A47	-	-	+	+	+	+	-	-
A48	L(+)	-	-	-	-	-	-	-
A49	+	-	+	L(+)	-	+	-	+
A50	+	-	-	+	-	+	-	+
A51	L(+)	-	-	-	-	+	-	+
A52	+	-	+	-	+	+	-	L(+)
A53	+	+	+	+	-	+	-	+
A54	+	-	+	+	-	+	-	+

La tabla da información acerca de la capacidad para producir ácido a partir de diferentes fuentes de carbono, dicha actividad se evaluó como: Positiva (+), levemente positivo (L (+)) y Negativo (-).

De los datos presentados en la tabla anterior se puede afirmar que el 67,92 % de las cepas producen ácido de la D-manosa, mientras que solo el 18,87 % de cepas producían ácido a partir de maltosa. En cuanto a la cepas A29 y A22 produjeron ácido a partir de siete de las ocho fuentes de carbono probadas, a diferencia de la cepa A26 fue ácido-negativo para todas las fuentes de carbono ensayadas, de igual

manera la cepa A41 y A48 sólo fueron levemente positivas a una fuente carbono, y las cepas A04 y A25 fueron positivas a una sola fuente de carbono.

6.4.3. **Actividad hidrolítica.** Se observó que el 98,11 % de las cepas eran capaces de producir enzimas extracelulares, estando presente las amilasas y caseínas en la mayoría de las cepas con un 92,5 % y un 88,7 % respectivamente, mientras que la presencia de esculinasas fue la actividad enzimática de menor frecuencia presente en un 22,6 % de cepas (Datos presentados en la Tabla 6).

Tabla 6: Actividad enzimática

CEPA	Urea	Almidón	Gelatina	Caseína	Esculina	Nitratos	Catalasa
A01	-	+	+	+	-	-	+
A02	-	+	+	+	+	-	+
A03	+	+	+	+	-	+	+
A04	+	+	+	+	-	+	+
A05	-	+	+	+	-	-	+
A06	+	+	+	+	+	-	+
A07	+	+	+	+	-	-	+
A08	-	-	+	+	-	+	+
A09	+	+	+	+	-	-	+
A10	-	+	+	+	+	+	+
A11	-	+	+	+	-	-	+
A12	-	+	+	+	+	+	+
A13	-	+	+	+	-	+	+
A14	-	+	+	+	+	-	+
A15	+	+	+	+	+	-	+
A16	-	+	+	+	-	+	+
A17	-	+	-	+	-	-	+

CEPA	Urea	Almidón	Gelatina	Caseína	Esculina	Nitratos	Catalasa
A18	-	+	-	+	-	+	+
A19	+	+	-	Nd	-	+	+
A20	-	+	+	+	-	-	+
A21	-	+	-	-	+	-	+
A22	+	+	-	+	-	+	+
A23	-	-	-	-	-	-	+
A24	+	+	+	-	-	+	+
A25	+	+	+	+	-	+	+
A26	-	+	+	+	-	+	+
A27	-	+	-	+	-	+	-
A28	-	+	+	+	-	+	+
A29	-	+	-	+	-	+	-
A30	-	+	+	+	-	+	+
A31	-	+	+	+	-	+	+
A32	-	+	-	+	-	-	+
A33	+	+	+	+	-	-	+
A35	+	+	-	+	-	-	+
A36	-	+	+	+	-	-	+
A37	-	+	+	+	+	-	+
A38	-	+	+	+	-	-	+
A39	-	+	+	+	-	-	+
A40	-	+	+	+	-	+	+
A41	+	+	-	+	-	-	+
A42	-	+	+	+	-	+	-
A43	-	+	-	+	-	+	+
A44	-	+	+	+	+	-	+

CEPA	Urea	Almidón	Gelatina	Caseína	Esculina	Nitratos	Catalasa
A45	-	+	+	+	+	-	+
A46	-	+	+	+	-	-	+
A47	+	-	+	+	-	-	-
A48	+	+	+	+	+	-	+
A49	+	+	+	+	-	+	+
A50	Nd	+	+	+	-	+	+
A51	+	+	+	+	+	-	+
A52	-	+	-	+	-	-	+
A53	Nd	+	+	Nd	-	+	+
A54	+	Nd	-	Nd	-	-	+

+: Hidroliza el sustrato ensayado
 -: No hidroliza el sustrato ensayado
 Nd: No determinado

En la tabla anterior se observa que las cepas A06, A15, A48 y A51 pueden hidrolizar los cuatros sustratos ensayados, mientras que la cepa A23 no fue capaz de hidrolizar ninguno de los compuestos ensayados.

6.4.4. Catalasa

En cuanto a la actividad catalasa solo las cepas A29 y A42 fueron negativas, y las cepas A21, A23, A25, A26, A41, A43 y A53 fueron débilmente positivas.

6.4.5. Reducción de nitratos

La actividad de nitratos fue positiva para las cepas A03, , A04, A08, A10, A12, A13, A16, A18, A19, A22, A24, A25, A26, A27, A28, A29, A30, A31, A40, A42, y A43, A49, A50 y A53. Lo cual indica que estas cepas presentan respiración anaerobia, donde el aceptor de electrones final es el nitrato. En cuanto al producto final de esta reacción es el nitrito, ya que dicha prueba se reveló con el reactivo de Griess el cual es específico para detección de nitritos.

6.5. METABOLISMO SECUNDARIO

6.5.1. Actividad antimicrobiana.

En cuanto a la actividad antimicrobiana se analizó contra levaduras, bacterias Gram positivas y Gram negativas como se mencionó en el numeral 6.1 de la metodología, donde solo el 7,55 % de las cepas no mostraron actividad contra ningún patógeno, mientras las cepas A24 y A49 mostraron actividad contra nueve cepas patógenas (Como se observa en la tabla 7).

Tabla 7: Actividad antimicrobiana de Actinobacterias aisladas de nódulos

	<i>S. parathyphi</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumani</i>	<i>S. saprofiticus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. alcalifaciens</i>	<i>R. equi</i>
A01	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	-
A02	-	9	-	-	-	-	-	-	-	nd	-	nd	-	-	-
A03	-	10	10	-	2	-	2	10	12	-	-	6	-	12	-
A04	-	-	-	-	-	-	-	7	17	2	-	6	-	-	-
A05	-	-	-	-	-	-	-	23	17	-	-	-	-	-	-
A06	-	-	-	-	-	-	-	9	21	-	-	3	-	-	-
A07	-	-	-	-	-	-	-	-	15	-	-	-	-	-	-
A08	-	-	-	-	7	-	-	13	13	-	-	-	-	29	-
A09	-	-	-	-	-	15	-	-	10	-	-	-	-	-	-
A10	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	8	-	-	-
A11	-	-	-	-	-	-	-	-	15	-	-	-	-	-	-
A12	-	-	-	-	-	3	-	-	15	-	-	-	4	-	-
A13	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A14	-	-	-	5	-	-	-	-	8	-	-	-	nd	nd	-
A15	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	8	-	-	-
A16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-	-
A17	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	nd	-	-
A18	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-
A19	-	-	4	5	nd	nd	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd

	<i>S. paratyphi</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumani</i>	<i>S. saprofiticus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. alcalifaciens</i>	<i>R. equi</i>
A20	-	-	-	-	2	5	-	-	-	-	-	6	-	-	-
A21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A22	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	7	-	-	-
A23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A24	-	1	-	3	10	4	-	4	-	-	15	5	-	33	8
A25	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	8	-	-	-
A26	-	-	2	-	-	2	-	-	-	-	-	-	2	-	-
A27	-	-	16	-	-	-	-	7	10	-	-	12	-	11	-
A28	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	16	Nd	-	-	-
A29	-	-	17	-	-	-	-	-	7	-	-	8	-	-	-
A30	-	3	-	5	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	3	-	-
A32	-	-	13	21	-	18	-	-	-	2	-	-	5	-	-
A33	7	-	-	21	-	-	-	16	16	4	-	16	19	-	-
A35	7	4	-	28	-	-	4	16	23	-	-	-	-	27	7
A36	2	-	-	-	-	-	-	2	14	-	-	-	-	4	6
A37	-	-	-	-	-	4	3	-	18	-	-	-	3	-	-
A38	-	-	-	-	-	6	-	-	20	-	-	8	-	-	-
A39	-	-	-	-	-	5	-	-	15	-	-	9	-	-	-
A40	6	-	-	-	-	-	19	12	17	4	-	16	-	-	8
A41	6	-	-	-	-	-	-	3	12	-	-	-	-	-	3
A42	-	-	7	-	-	-	-	10	16	2	-	-	-	-	-
A43	5	-	12	-	-	-	-	5	13	3	-	-	-	-	-
A44	2	-	27	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-
A45	-	-	10	-	-	-	-	6	11	-	-	-	-	-	-
A46	-	15	9	-	-	-	-	30	29	-	-	-	-	2	-
A47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A48	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	nd	-	-
A49	-	8	15	-	14	5	3	11	24	-	-	16	-	17	-
A50	-	-	6	-	-	9	6	-	7	-	-	5	-	-	-
A51	-	-	-	-	-	-	-	6	11	-	-	-	-	-	-
A52	-	-	-	-	nd	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-
A53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	-	nd	nd
A54	3	-	-	-	-	nd	-	-	-	5	nd	nd	nd	nd	nd

-: Actividad antimicrobiana negativa; **nd**: No determinada; los números expresan los mm de los diámetros de inhibición.

Los halos observados oscilaban en diámetros entre 1 a 30 mm, como se observa en la imagen 6.

Imagen 6: Halos de inhibición



En la fotografía se observa halos de inhibición con diámetros de inhibición de diámetros pequeños así como de diámetros significativos, Fotografía autor.

En el grafico 1 se observa que la cepa más susceptible fue *Klebsiella oxytoca*, al ser inhibida por el 54,7 % de las cepas, mientras que *Acinetobacter baumannii* fue la cepa más resistente al ser inhibido solo por el 3,7%. Vale la pena mencionar que el 22,64% de cepas presentaron actividad frente al menos un microorganismo patógeno, el 58,5% contra 2 a 6 patógenos y el 11,32% presentaron actividad frente a 7 o 8 patógenas.

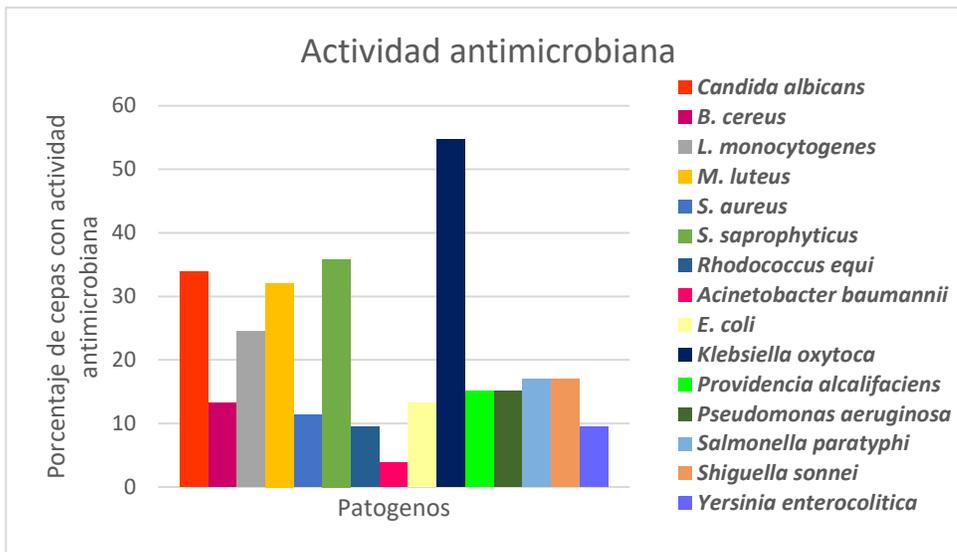


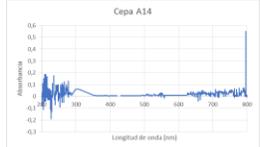
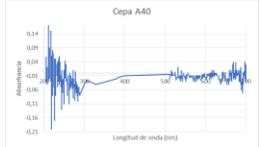
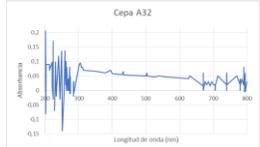
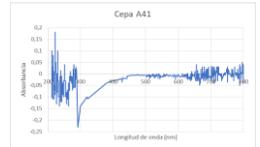
Gráfico 1: Actividad antimicrobiana

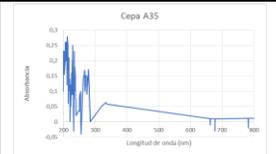
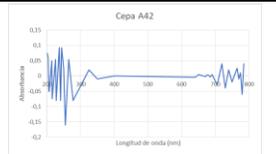
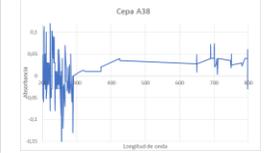
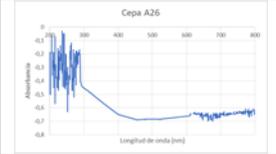
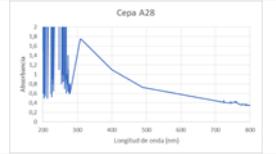
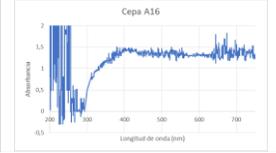
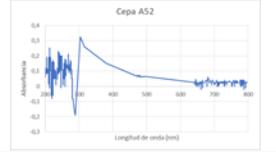
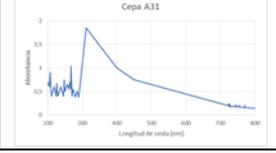
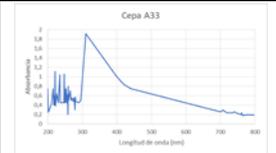
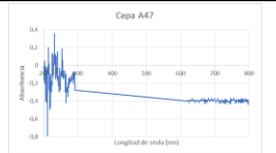
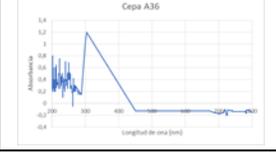
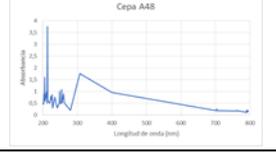
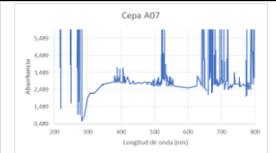
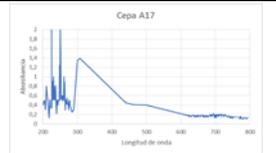
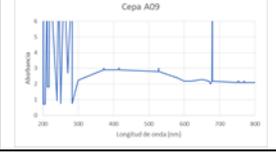
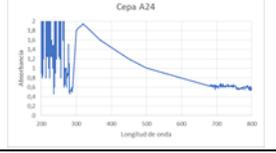
En el gráfico se observan las diferentes cepas patógenas ensayados vs el porcentaje de cepas que mostraron actividad antimicrobiana.

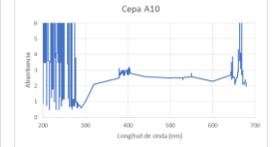
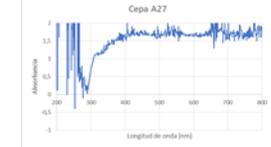
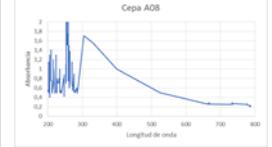
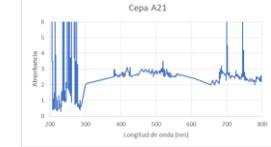
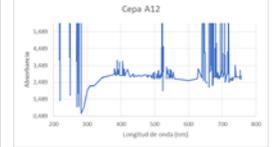
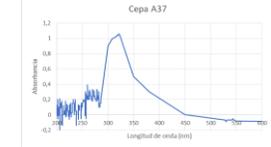
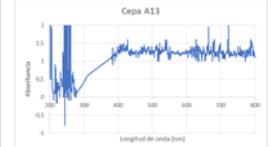
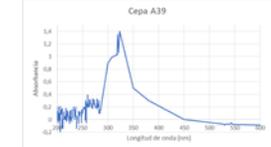
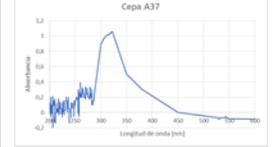
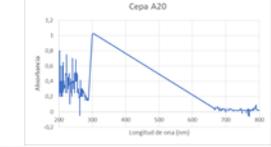
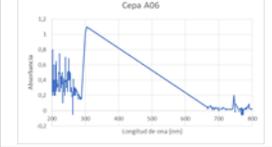
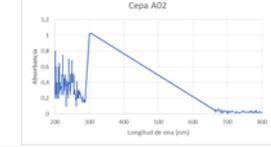
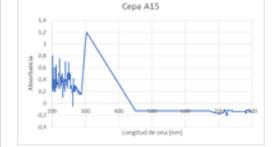
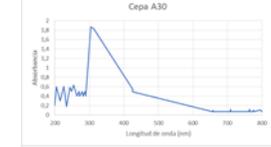
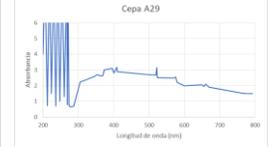
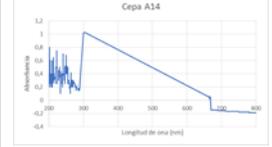
6.5.2. Producción de pigmentos.

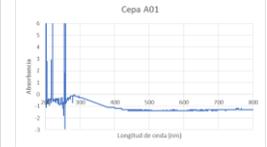
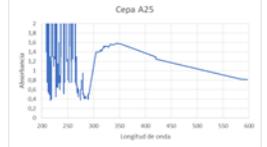
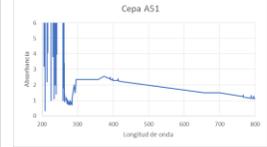
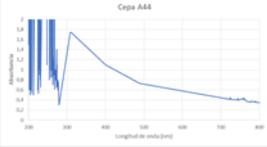
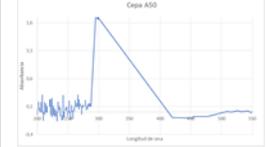
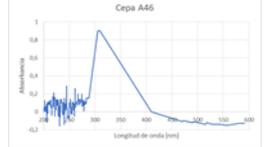
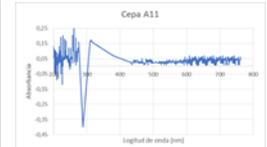
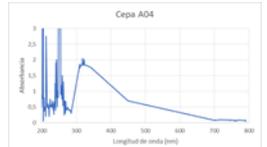
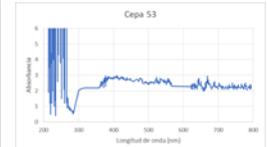
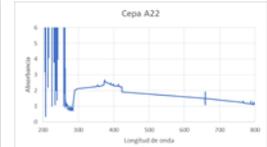
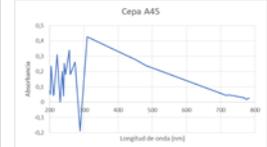
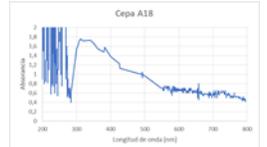
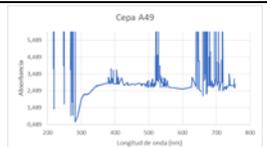
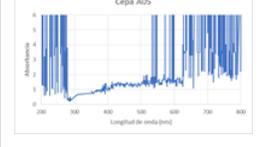
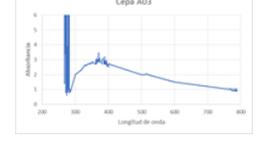
La producción de pigmentos se observó en el 86,79% de cepas, los pigmentos producidos presentaban tonos que iban desde blanco grisáceos, pasando por amarillos, naranjas, marrones rojizos, hasta llegar a oliva grisáceo oscuro como se observa en la tabla 8:

Tabla 8: Pigmentos producidos por las cepas

Grupo 1: Sin pigmento visible					
Cepa	Producción de pigmentos	Gráfico espectro	Cepa	Producción de pigmentos	Gráfico espectro
A14			A40		
A32			A41		

A35			A42		
A38			A43		
Grupo 2: Amarillos					
Amarillo-blanco					
A26			A28		
Amarillo verdoso palido					
A16			A52		
A31					
Amarillo verde palido					
A33			A47		
A36			A48		
Amarillos palidos					
A07			A17		
A09			A24		

A10			A27		
Amarillo claro					
A08			A21		
A12			A37		
A13			A39		
Grupo 3: Amarillo-Naranja					
Amarillo naranja palido			Amarillo naranja moderado		
A37			A20		
Amarillo naranja claro			Amarillo naranja fuerte		
A06			A02		
A15			A30		
A29					
Grupo 4: Naranja rojizo					
A14					

Grupo 5: Marrón rojizo					
Marrón rojizo claro			Marrón rojizo grisáceo claro		
A01			A25		
A51			A44		
A50			A46		
Grupo 6: Mátrones					
Marrón amarillento claro			Marrón amarillento oscuro		
A11			A04		
A53			Marrón-naranja		
A22					
A45			A18		
			Marrón oliva oscuro		
A49					
Grupo 7: Olivas					
A05			A03		

En la tabla se observan los pigmentos producidos por cada una de las cepas y su respectivo grafico del barrido espectrofotométrico. Los pigmentos se encuentran agrupados en base al color observado.

6.5.3. Análisis de extractos crudos por espectrofotometría

En la mayoría de extractos crudos se hizo evidente una gran cantidad de picos en el espectro no visible como se observa en la tabla 8, además de esto se observó un pico a 300 nm en varios de los barridos espectrofotométricos de los extractos crudos, también se hizo evidente una tendencia a poseer pocos o ningún pico en el espectro visible y posterior a los 650 nm se observaban otra vez (Anexos 4).

7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

7.1. Análisis de las características fenotípicas y ubicación taxonómica presuntiva

Con base en las características fenotípicas como color de colonia, forma, borde, elevación, estructuras microscópicas como filamentos, esporangiosporas, esporangios y las diferentes pruebas bioquímicas se consiguió identificar presuntivamente un 75,11% de las cepas aisladas. Los géneros más frecuentes fueron ***Actinoplanes sp***, ***Nocardia sp***, ***Micromonospora sp***. Lo anterior se realizó usando las claves y guías taxonómicas de Goodfellow M (2012).

Todas las cepas aisladas pertenecían al subreino bacteria, Grupo *Terrabacteria*, filo *Actinobacteria*, clase *Actinobacteria* y fueron ubicadas dentro de los siguientes géneros.

- Orden: Corynebacteriales
 - Familia: Nocardiaceae
 - Género: ***Nocardia***

Son aeróbicas, quimiorganotrofas, catalasa positiva y poseen un metabolismo oxidativo. En este género se encuentran las cepas A04, A10, A13, A20, A27, A31, A32, las cuales presentaron colonias con las características descritas para este género; colonias naranjas a marrón con elevación convexas (A04 y A10), naranjas con elevación pulvinada (A13, A20, A32) y naranjas con elevación convexa (A27 y A31), en cuanto a la micromorfología se observaron hifas ramificadas sin esporas, y se observaron fragmentos en forma bacilar excepto en la cepa A04, además de esto todas las cepas fueron catalasa positiva. Este género es productor de enzimas industriales y metabolitos bioactivos, entre estos se destaca la antinomicina B, nocardicina, tubelactomicina, entre otros compuestos, en el presente estudio todas las cepas pertenecientes a este género fueron activas contra al menos una cepa patógena demostrado la producción de compuestos activos. Este género también se caracteriza por la producción de pigmentos difusibles amarillos y marrones, las cepas A04, A10, A13, A20, A31 produjeron pigmentos de color amarillo, pero ninguna cepa produjo pigmentos de color marrón. (Goodfellow *et al.*, 2012)

- Orden: Corynebacteriales
 - Familia: Gordoniaceae
 - Género: **Gordonia**

Son Gram positivos o Gram variables, aerobios, catalasa positiva. Están distribuidos en hábitats acuáticos terrestres, en suelos, sedimentos marinos y sistemas de aguas residuales. Degradan diferentes compuestos orgánicos y pueden utilizar una amplia diversidad de fuentes de carbono. En este género se ubicaron las cepas A05 y A30, ya que se observaron al microscopio hifas elementales, levemente ramificadas, con fragmentos bacilares pequeños. Cuyas colonias iban de amarillo-naranja a naranja A05 y de rosa amarillento a naranja A30. Además de esto la cepa A30 produjo un pigmento naranja, el cual es producido por algunas de las especies de este género, y es asociado con carotenos. Este género también tiene un gran potencial metabólico ya que también produce biosurfactantes y tienen un gran potencial en procesos de biorremediación. Las cepas fueron identificadas presuntivamente como **G. alkanivorans** con un 80% (A05) y un 73,3% (A30). (Goodfellow *et al.*, 2012)

- Orden: Frankiales
 - Familia: Frankiaceae
 - Género: **Frankia**

Son ampliamente conocidos por su capacidad de fijar nitrógeno y estimular la formación de nódulos en plantas actinorrizicas. Poseen propiedades como hifas extensamente ramificadas, pigmentos naranjas, rojos y negros extra e intracelulares, son catalasa positiva. En este género situamos a la cepa A26 la cual presento un esporangio con hifas extensamente ramificadas, presento una pigmentación naranja en medios sólidos, en cuanto a su metabolito secundario solo presentó actividad antimicrobiana leve frente a 3 patógenos y generó un pigmento oliva grisáceo. (Goodfellow *et al.*, 2012)

- Orden: Jiangellales
 - Familia: Jiangellaceae
 - Género: **Jiangella**

Este género ha sido aislado de desiertos, partes de plantas, suelos, paredes de bodegas y suelos salinos. La cepa A35 se identificó presuntivamente dentro de este

género al presentar colonias de color amarilla-naranja, sin producción de pigmento, con hifas sin esporas que se fragmentan en varillas. En este género no se describe la actividad metabólica.(Goodfellow *et al.*, 2012)

- Orden: Micromonosporales
 - Familia: Micromonospora
 - Género: ***Actinoplanes***

Los miembros del género *Actinoplanes* suelen ser microorganismos saprofitos de suelos, capaces de degradar compuestos orgánicos, estos también pueden colonizar plantas y animales. La mayoría de miembros de este género suelen utilizar como única fuente de carbono la D-glucosa, L-arabinosa, manosa y maltosa, así como también poseen la capacidad de hidrolizar caseína, gelatina y almidón. En el presente estudio las cepas A02, A33, A38, A42, A43, A44, A45, A48, A52 fueron clasificadas dentro de este género ya que dichas cepas presentaron colonias que iban de tonos naranjas con zonas blancas (A02), naranjas (A33, A42, A43, A52), naranja a rojo (A14), naranjas a marrón rojizo (A38) y naranja a marrón (A44, A45, A48). Solo una de las cepas aisladas mostro micelio aéreo de color blanco con apariencia polvorosa debido a una alta producción de esporangios en el micelio aéreo, esto concuerda con la literatura ya que muy pocas cepas lo producen. Además de esto se pudo observar la presencia de esporangios germinados desarrollando nuevo micelio, hifas ramificadas e hifas empalizadas. Además todas las cepas mostraron actividad amilasa, caseínasa y gelatinasa a excepción de la cepa A43 que no hidrolizó la gelatina. Este género produce más de 120 antibióticos con amplia diversidad de químicos, lo que concuerda con nuestros resultados ya que la cepa A33 logro inhibir la mayoría de cepas patógenas, así como también las cepas A02, A14, A38, A42, A43, A44, A45, A48 y A52 mostraron poseer actividad antimicrobiana. Añadiendo que la mayoría de cepas de este género tienen actividad contra ***C. albicans***, en este trabajo 4 de 7 cepas mostraron actividad contra ***C. albicans***. Este género también se caracteriza por producir pigmentos difusibles, en este caso la cepa A02 produjo un pigmento naranja, el cual puede asociarse con la producción de carotenoides; mientras que la cepa A52 produjo una coloración amarillo verdosa translúcida, la cepa A14 un pigmento de color naranja rojizo y la cepa A44 marrón rojizo (Goodfellow *et al.*, 2012).

- Orden: Micromonosporales
 - Familia: Micromonospora
 - Género: ***Micromonospora sp***

Suele ser el género predominante en comunidades aisladas de plantas de líquenes, raíces y suelos, además de esto se pueden encontrar en zonas áridas gracias a su capacidad de degradar biopolímeros. Son microorganismos Gram positivos, ácido lento, que crecen en un rango de temperatura de 20 a 40 °C. En este género se encuentra la cepa A07, A09, A46, A47 y A49 ya que presentaron colonias típicas del género, que iban de tonos naranja moderado a marrón (A09 y A49), de naranja a marrón con formación de una masa negra en la superficie debido a formación de esporas (A07), de naranja a negro (A46) y naranja amarillo a marrón (A47), estas cepas poseían colonias con elevación, en cuanto a estructuras microscópicas se observaron hifas ramificadas, esporas solas y esporas en esporóforos cortos, las cuales son estructuras típicas de dicho género. Estas cepas son Gram positivas, como todos los miembros de este género. En cuanto a la producción de pigmentos este género es muy diverso, algunas pueden generarlos mientras que otras no, en este caso la cepa A07, A09 y A49 presentaron pigmentos difusibles. Se caracterizan por producir metabolitos secundarios entre los cuales producen aminoglucósidos, ansamicinas, antraciclina, antraquinonas, entre otros compuestos. En cuanto a las cepas obtenidas en este trabajo, A49 mostró actividad antimicrobiana contra 9 de las 15 cepas patógenas probadas, además esta cepa logró producir un pigmento difusible de color oliva, el cual es característico de ***M. olivasterospora***, con base a lo anterior y pruebas bioquímicas la cepa A49 fue identificada presuntivamente como ***M. olivasterospora*** con un 81,25% de similitud, teniendo en cuenta que los resultados de utilización de fuente de carbono pueden variar de un autor a otro dependiendo del medio de sales mínimo usado. La cepa A07 solo mostró ser activa contra ***Klebsiella oxytoca*** y producir un pigmento amarillo, de igual manera la cepa A09 presentó producción de pigmentos amarillos y actividad contra ***M. luteus*** y ***K. Oxytoca***. La cepa A46 mostró actividad contra ***E. coli***, ***L. monocytogenes***, ***C. albicans***, ***K. oxytoca*** y ***P. alcaligenes***. Siendo la cepa 47 la única cepa que no mostró actividad antimicrobiana, pero esta cepa podría producir otro tipo de compuestos activos. (Goodfellow *et al.*, 2012)

- Orden: Micromonosporales
 - Familia: Micromonospora
 - Género: ***Couchioplanes***

En este género se ubicaron las cepas A41 y A24 en base a la morfología microscopía, en ambas cepas se observó grupos de cadenas de esporas y micelio aéreo que parece un esporangio, también se observó en A41 hifas ramificadas pero no fragmentadas. Ambas cepas mostraron ser Gram positivas. Este género ha producido fungicidas de amplio espectro y también producen antibióticos, estas dos cepas mostraron actividad contra las cepas patógenas, donde la cepa A24 resaltó por tener actividad frente a nueve cepas. En cuanto a producción de pigmentos la cepa A24 produjo un pigmento de color amarillo.(Goodfellow *et al.*, 2012)

- Orden: Micromonosporales
 - Familia: Micromonospora
 - Género: ***Dactylosporangium***

Los miembros de este género se encuentran ampliamente distribuidos en todo el mundo, son microorganismo aeróbicos y mesófilos. En este género se ubicaron las cepas A01 y A39, ya que presentaron la morfología típica de este género, colonias naranjas a marrón (A01) y de amarillo a marrón (A39), además de esto se observaron hifas ramificadas con presencia de cuerpos globosos, y en la cepa A01 se observaron zoosporas germinadas. Con base a los perfiles bioquímicos la cepa A01 es presuntivamente ***D. thailandense***, ya que concuerda el color de colonia, producción de pigmento difusible de color marrón rojizo, reducción de nitratos negativa, caseína positivo, almidón positivo, en cuanto a utilización de fuentes de carbono algunos resultados no concordaron. En cuanto a la cepa A39 no se pudo identificar con ninguna de las cepas actualmente descritas, al poseer un perfil bioquímico diferente a las cepas con su morfología. En cuanto a producción de metabolitos secundarios este género tiene una gran capacidad biosintética, produciendo antibióticos con una amplia variedad de estructuras químicas, compuestos anti-fúngicos, antiparasitarios, antitumorales, bactericidas, herbicidas, promotores de crecimiento animal, entre otros. Un ejemplo de estos compuestos es la dactimicina que actúa contra un amplio espectro de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas. En cuanto a la actividad biosintética se puede decir que ambas la poseen, infiriéndolo a partir de los resultados obtenidos en los ensayos de actividad antimicrobiana y en el análisis espectrofotométrico del extracto crudo, en los cuales la cepa A01 solo mostró actividad contra ***S. parathyphi*** y produjo un pigmento marrón rojizo, mientras que la cepa A39 mostro actividad contra ***S.***

saprofiticus, *K. oxytoca* y *M. luteus*, y presentó un pigmento de color amarillo.(Goodfellow *et al.*, 2012)

- Orden: Micromonosporales
 - Familia: Micromonospora
 - Género: ***Virgisporangium***

Estos microorganismos crecen en un rango de temperaturas que van de 15 a 37 °C son microorganismos heterotróficos con metabolismo oxidativo. Se logró identificar la cepa A18 y A29 como ***Virgnisporium auranticum*** con un 92,9 % y un 85,71 % de identidad respectivamente, gracias a características como micelio de color naranja, presencia de hifas ramificadas, y pruebas bioquímicas. Ambos mostraron capacidad para producir pigmentos de color naranja y actividad antimicrobiana, siendo la cepa A18 específica para ***S. saprophyticus*** mientras que A29 mostro actividad frente a tres patógenos.(Goodfellow *et al.*, 2012)

- Orden: Propionibacteriales
 - Familia: Nocordiaceae
 - Género: ***Nocardioides***

Los miembros de este género son considerados quimiorganotrofos, aerobios, capaces de utilizar y degradar una amplia gama de compuestos como fuentes de energía, pueden ser extensamente ramificados o tener formas bacilares. Frecuentemente se encuentran en rizósfera, raíces y plantas. En esta interacción endófito ellos obtienen nutrientes, protección a condiciones de estrés, a cambio promueven el crecimiento de la planta y la protegen frente a diferentes enfermedades. Las colonias pueden ser blancas, cremas, amarillas y raramente naranjas. En este género se ubicó la cepa A12, ya que era Gram positiva, poseía hifas ramificadas, fragmentos en formas bacilares, y colonias amarillo-naranjas. Este género tiene la capacidad de degradar diferentes compuestos contaminantes, además de esto han mostrado potencial para producir antibióticos, antitumorales y anti fúngicos. En cuanto a la cepa A12 solo mostró actividad frente a tres patógenos, siendo significativo solo contra ***K. oxytoca***.(Goodfellow *et al.*, 2012)

- Orden: Pseudonocardiales
 - Familia: Pseudonocardiaceae
 - Género: ***Actinokineospora***

Los microorganismos pertenecientes a este género forman micelio y colonias en la superficie del medio. Son aerobios Gram positivos, catalasa positiva. Se han aislado de suelos, lagos y hojas caídas. Nosotros logramos obtener una cepa perteneciente a este género A17, siendo identificada presuntivamente como ***Actinokineospora auranticolor*** con un 80 % de similitud, esta especie recibe su nombre por la coloración amarillo-naranja que poseen sus colonias, las cuales se pudieron observar en la cepa A17. El potencial metabólico de este género no ha sido reportado, en el presente estudio mostró baja actividad microbiana y producción de un pigmento amarillo.(Goodfellow *et al.*, 2012)

- Orden: Pseudonocardiales
 - Familia: Pseudonocardiaceae
 - Género: ***Prauserella***

Los miembros de este género son Gram positivos, no motiles, aeróbicos, metabolismo oxidativo, pueden crecer en amplia variedad de fuentes de carbono. La cepa A08 presentó hifas extensamente ramificadas cuando se observó al microscopio, las cuales se asocian con este género, también presento colonias amarillas brillantes en ISP2-M, coloración típica de este género en dicho medio, ya que en otros medios de cultivos presentan otras coloraciones. Posteriormente al comparar las pruebas bioquímicas con las diferentes especies, se identificó presuntivamente como ***P. aidingensis*** con una similitud del 85,71%. En cuanto al potencial metabólico de esta especie no se encuentra documentado, pero esta cepa mostró actividad antimicrobiana frente a cuatro patógenos, y se resalta su actividad frente ***P. alcalifaciens*** y produjo un pigmento de color amarillo.(Goodfellow *et al.*, 2012)

- Orden: Pseudonocardiales
 - Familia: Pseudonocardiaceae
 - Género: ***Pseudonocardia***

Aeróbicos, Gram positivos, catalasa positiva, no ácido rápido, no motiles. Se caracterizan por presentar hifas ramificadas que se fragmentan a formar bacilares,

crecen en amplia gama de medios orgánicos y sintéticos, algunas especies son autótrofas facultativas. Este género ha sido aislado de suelos, de plantas, costas y sedimentos marinos, aire, materiales clínicos y compost. La morfología de la colonia suele variar entre especies y medio de cultivo usado. Con base a lo anteriormente descrito se ubicó la cepa A25 en este género. Se ha informado que este género forma asociaciones mutualistas, cuyo papel en esta relación es la producción de antibióticos, frente a otros competidores. En cuanto a la cepa A25 presentó baja actividad antimicrobiana pero logró producir un pigmento marrón. (Goodfellow *et al.*, 2012)

- Orden: Pseudonocardiales
 - Familia: Pseudonocardiaceae
 - Género: **Saccharopolyspora**

Son aeróbicos, Gram positivos, no ácido rápido, catalasa positivo. Han sido aislados de diferentes hábitats, entre estos se encuentran materiales de plantas, suelos, sedimentos, esponjas, entre otros. Producen una amplia gama de antigénicos. En este género se ubicó la cepa A15 que presentó micelio ramificado, fragmentos en forma de varilla, colonias de color naranja, amarillas y marrones dependiendo del medio de cultivo en el que se sembrara, las cuales son típicas de este género. (Goodfellow *et al.*, 2012)

- Orden: Streptosporangiales
 - Familia: Nocardiosporaceae
 - Género: **Nocardiopsis**

Son Gram positivos, aeróbicos, quimiorganotrofos, no ácido rápido, no motiles, hifas largas y densamente ramificadas, se fragmentan en cocos y elementos bacilares. Son conocidos por producir metabolitos bioactivos, los cuales son usados para la generación de productos comerciales, como son antibióticos y enzimas. Además de esto degradan y transforman los compuestos orgánicos. Son frecuentemente aislados de suelos, desperdicios de algodón, glaciares antárticos, sedimentos de mar profundo, ambientes interiores y establos. En este género se clasificó la cepa A19 la cual presentaba colonias típicas de color blanco verdoso y amarillo pálido dependiendo del medio, además se observaron hifas extensamente ramificadas y elementos bacilares. Aunque este género se caracteriza por su actividad antimicrobiana, la cepa aislada tuvo baja actividad antimicrobiana. (Goodfellow *et al.*, 2012)

- Orden: Streptosporangiales
 - Familia: Streptosporangiaceae
 - Género: ***Streptosporangium***

Este género se caracteriza porque sus miembros son aerobios, Gram positivos, ácido lento. Dicho género se ha aislado de sedimentos costeros, estiércol de vaca, lombrices, suelos de bosques, hojas, raíces de plantas, sedimentos de lagos y agua fresca. En este género se situaron las cepas A28 y A36, las cuales presentaron características morfológicas típicas de este género, como coloración rosada amarillenta con masa de esporas blancas (A28), coloración de tonos marrones con masas de esporas de color negro (A36). En cuanto a la micromorfología se observó micelio ramificado, no fragmentado y esporóforos cortos (A28, A36). La cepa A28 fue identificada presuntivamente como ***S. violacechromogenes*** con un 91,66 % de confianza, y la cepa A36 fue identificada como ***S. amethystogens sub sp fukuense*** con un 83,33% de confianza. En cuanto al potencial metabólico ambas cepas mostraron actividad antimicrobiana y producción de pigmentos, lo que concuerda con dicho género, ya que resalta por ser una fuente rica de nuevos productos comerciales, especialmente antibióticos, entre los cuales encontramos como lipopeptidos, glicopeptidos, selemicida, antraciclina, esporomicina, entre otros.(Goodfellow *et al.*, 2012)

- Orden: Streptosporangiales
 - Familia: Thermomonosporaceae
 - Género: ***Thermomonospora***

Son organismos aeróbicos, Gram positivos, no ácido rápido, quimiorganotrofos que forman hifas ramificadas. Generalmente son aislados de compost y juega un papel importante en la degradación celulosa y de lignocelulosa. La cepa A37 se identificó presuntivamente como ***Thermomonospora curvata***, por características como color de micelio naranja-amarillo, presentar hifas ramificadas con esporóforos laterales con esporas, y por los diferentes pruebas bioquímicas realizadas, siendo el porcentaje de similitud de 82,35%.(Goodfellow *et al.*, 2012)

En cuanto a la ubicación taxonómica presuntiva las cepas A03, A06, A11, A14, A16, A21, A22, A23, A40, A50, A51, A53 y A54 no fue posible establecerlas dentro de un taxón específico, ya que no concordaron las características bioquímicas, macro y microscópicamente con ninguno de los géneros descritos. Pero puede que las

cepas A06, A40, y A51 pertenezcan a un mismo género, ya que presentaron una alta similitud en las diferentes características analizadas.

7.1.1. Diversidad de Actinobacterias cultivables

Los nódulos de *Lupinus sp* resultaron ser un hábitat con una amplia diversidad de microorganismos endófitos pertenecientes a la clase Actinobacteria como se observa en el gráfico 3, ya que se lograron obtener 17 géneros, pertenecientes a 10 familias de siete órdenes.

Esta diversidad también se hace notoria en los datos obtenidos de utilización de fuentes de carbono donde estos fueron heterogéneos ya que algunas cepas fueron capaces de usar la mayoría de sustratos probados mientras que otras solo una fuente de carbono, dándonos indicios de lo diverso que puede llegar a ser el metabolismo de la clase Actinobacteria.

Agregando que las cepas aisladas de nódulos poseen un alto potencial biotecnológico, lo cual se demuestra con los resultados obtenidos en cuanto a actividad antimicrobiana, producción de pigmentos, análisis de espectros e identificación presuntiva, donde dichos datos sugieren la producción de antibióticos y compuestos bioactivos. Estos resultados destacan el gran potencial biotecnológico que tienen las Actinobacterias aisladas de nódulos.

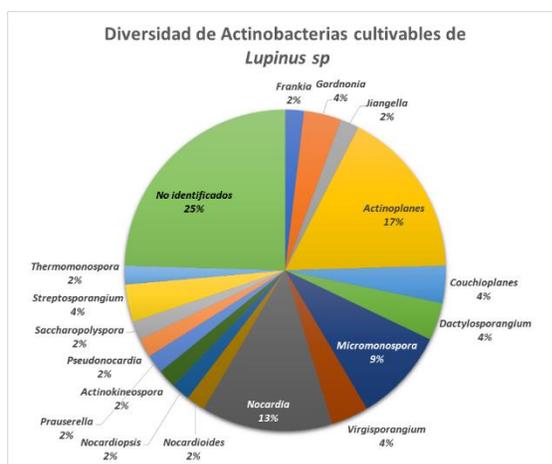


Gráfico 2: Diversidad de Actinobacterias cultivables de *Lupinus sp*

En el gráfico se encuentra el porcentaje de cepas aisladas para cada uno de los géneros.

De manera general se observó que la composición de los medios de cultivo afecta el crecimiento de las cepas y las características, este comportamiento ya había sido observado por otros autores, entre los cuales encontramos el grupo de Parada en 2017 (Parada *et al.*, 2017). En el presente trabajo las cepas A01, A25 y A06 no crecieron en el medio ISP2-M, esto puede ser explicado ya que como fuente de carbono solo poseía 4 g/L de glucosa, y dicha cantidad no es suficiente para promover el crecimiento, por el contrario el medio que resultó ser mejor para el crecimiento y desarrollo de las cepas fue el medio ISP4 al promover un crecimiento rápido y estimular la producción de esporas de Actinobacterias, esto debido a dos aspectos principales: el primero hace referencia a la presencia de CaCO_3 en su composición, dicho compuesto ha mostrado promover el crecimiento y aislamiento de Actinobacterias, en primera medida porque alcaliniza el medio y los iones de calcio tienen la capacidad de estimular la formación de micelio aéreo en diferentes cultivos. Y como segundo aspecto que en su composición posee una concentración de fuente de carbono mayor que los otros dos medios.

En cuanto a los métodos y tiempos empleados para observar las micromorfologías, no se puede determinar que método y que tiempo resultan ser los más efectivos, ya que parece depender de las características de cada cepa.

7.2. Potencial biotecnológico de las cepas aisladas

7.2.1. Enzimas extracelulares

Como se mencionó anteriormente todas las cepas a excepción de la cepa A23 producían enzimas extracelulares. Estos resultados son similares a los de León J., en el cual todas las cepas aisladas poseían al menos una enzima extracelular, a diferencia del presente trabajo ellos obtuvieron un 95 % de cepas productoras de gelatinasas, 92 % amilasas, y 74 % caseinasas (León *et al.*, 2011), y en este trabajo se obtuvieron un 73,58 % de cepas productoras de gelatinasa, 92,5% de amilasas y 88,6% de caseinasas. En cuanto al ensayo de actividad amilasa se observaron los halos de manera más clara cuando se utilizó el medio ISP4, esto es debido a que contenía NaCl en su composición, mientras que el medio SA1 no, el porque es muy sencillo y se basa en la alfa-amilasa, ya que esta enzima no puede funcionar sin la presencia de cloruros o aniones relacionados.

7.2.3. Actividad antimicrobiana

Se observó que las cepas de estudio mostraron una actividad antimicrobiana marcada por una tendencia a inhibir el crecimiento de ***K. oxytoca***, ya que el 54,71% de cepas mostraron actividad inhibitoria frente a dicho patógeno, cuyos halos de inhibición oscilaron entre 6 mm a 29 mm, el cual es un resultado similar al obtenido en diferentes estudios como lo fueron los realizado en 2017 por Dholakiya y colaboradores, en donde determinaron el mayor halo de inhibición fue frente a ***Klebsiella pneumoniae*** de 24 mm (Dholakiya *et al.*, 2017), en el trabajo realizado por Singh y colaboradores en 2018, 6 cepas mostraron actividad frente a ***K. pneumoniae***, y la cepa en la cual enfocaron el estudio mostró un halo de inhibición de 23 mm (Singh *et al.*, 2018). Pero no concuerdan con los resultados obtenidos en 2018 por Jiang y colaboradores en el cual ***K. pneumoniae*** resultó ser la cepa más resistente a la actividad antimicrobiana de las cepas aisladas (Jiang *et al.*, 2018). La importancia de encontrar sustancias activas contra ***K. oxytoca*** recae en que puede generar abscesos hepáticos, bacteriemias y endocarditis nosocomiales (Escalante, Arregui, Muñoz, & Olivera, 2007; Roca, Ferrer, & Perez, 2005).

Otro patógeno que se vio fuertemente afectado por las cepas de interés fue ***S. saprophyticus***, indicándonos que es susceptible a los compuestos bioactivos producidos por dichas cepas, ya que el 35,85% de las cepas lograron inhibirlo, donde el diámetro mayor tamaño de inhibición fue de 16 mm y el menor de 3 mm. Este microorganismo es el agente etiológico de infecciones de tracto urinario que afectan a mujeres sanas, especialmente mujeres jóvenes embarazadas o sexualmente activas. En un estudio realizado las cepas de ***S. saprophyticus*** mostraron ser sensibles a la vancomicina, rifampicina, gentamicina y amoxicilina-ácido clavulánico, pero mostraron un porcentaje de resistencia a eritromicina 37,7%, que ha ido aumentando desde 1997 de manera significativa, también fueron resistente a clindamicina, cloranfenicol, cotrimoxazol, oxacilina y penicilina, únicamente el 0,9% no fue sensible a fluorquinolonas. Al haber una resistencia frente a la oxacilina no se podrá usar betalactámicos en el tratamiento de mujeres embarazadas, en las que no se debe emplear cotrimoxazol y quinolonas. Y es desde este punto de vista que se hace necesario el desarrollo de nuevos compuestos bioactivos efectivos, que puedan ser usados en mujeres gestantes (Orden-Martínez, Martínez-Ruiz, & Millán-Pérez, 2008).

Otros de los microorganismos que mostró ser susceptible a los metabolitos producidos por las cepas de interés fue ***C. albicans***, el cual fue inhibido por 18 de las 53 cepas, con halos de inhibición cuyos diámetros iban desde 4 a 30 mm, resultados parecidos fueron observados en 2011 por León y colaboradores en

donde 17 de 63 cepas mostraron actividad frente a **C. albicans** cepa 1511y 13 frente a **C. albicans** cepa 1511MIC (León *et al.*, 2011). Estos resultados son relevantes en la actualidad ya que los antimicóticos de uso clínico son escasos, agregando que la candidiasis es un enfermedad emergente y dicho microorganismos es considera como un agente oportunista de pacientes inmunocomprometidos e incluso inmunocompetentes. La candidemia y otras formas de candidiasis invasiva son considerada la principal causa de morbilidad y mortalidad, predominantemente en el grupo de inmunocomprometidos, neonatos y pacientes de la unidad de cuidados intensivos. En los Estados Unidos **Candida sp.** se encuentra entre los 5 agentes patógenos principales que causan infecciones nosocomiales en el torrente sanguíneo, siendo **C. albicans** responsable del 54% de casos (Srivastava & Dubey, 2016).

M. luteus demostró ser sensible a los metabolitos producidos por el 32,1% de cepas ensayadas, donde se observaron zonas de inhibición que iban desde 2 hasta 15 mm. Este microorganismo genera endocarditis, artritis séptica, meningitis bacteriana y neumonía. El 24,53% de las cepas aisladas mostraron actividad frente a **L. monocytogenes**, donde la mayor zona de inhibición fue de 27 mm, estos resultados son considerados positivos ya que se hace necesario tener diferentes fármacos para el tratamiento de las diferentes patologías causadas por este patógeno, entre las cuales encontramos endocarditis, meningitis, septicemia, conjuntivitis, neumonía, gastroenteritis y abscesos cutáneos, este patógeno es sensible a 23 antibióticos de uso clínico, pero en los últimos años se ha comenzado a ver cierta resistencia frente a algunos de ellos (Morvan *et al.*, 2010).

Otro aspecto a resaltar es que a diferencia de otros estudios se obtuvo un bajo porcentaje de cepas activas contra **S. aureus**, ya que en el estudio desarrollado por León y colaboradores en 2011, 54 de 62 cepas aisladas mostraron actividad frente a **S. aureus** (León *et al.*, 2011), así como también en el trabajo realizado en 2018 por Jing y colaboradores donde **S. aureus** mostró ser un organismo sensible a las sustancias activas producidas por las Actinobacterias (Jiang *et al.*, 2018).

Aunque solo el 15,1% de las cepas mostraron actividad frente a **P. alcalifaciens**, los resultados obtenidos son prometedores ya que se observaron zonas de inhibición grandes en la mayoría de cepas que presentaron actividad frente a este patógeno.

Un 13,4% de las cepas mostraron actividad frente a ***B. cereus*** y ***E. coli***, donde la mayor zona de inhibición fue de 19 mm y 15 mm, respectivamente, en este caso el presente trabajo obtuvo mejores resultados que los obtenidos por Wei y colaboradores en 2018, en donde ninguna cepa mostró ser activa frente a ***B. cereus*** y solo dos cepas contra ***E. coli***. La importancia de buscar sustancias antimicrobianas frente a esta cepa es que son de naturaleza abundantes e ubicuas, y pueden producir infecciones por el consumo de alimentos contaminados (W. Wei *et al.*, 2018).

Acinetobacter baumannii demostró ser el organismo más resistente frente a la actividad de las Acinobacterias, el cual solo fue inhibido por la cepa A24 y A28 con zonas de inhibición de 15 a 16 mm. La importancia de este microorganismo se atribuye a que en los últimos años ha aumentado su prevalencia y con ella sus mecanismos de resistencia, este microorganismo es una de las cepas que mayormente causan infección nosocomial en pacientes de cuidados intensivos. Actualmente se sabe que ha aumentado su resistencia a carbapenémicos, ceftazidima, piperacilina y colistina. Agregando que ha mostrado resistencias altas a B-lactámicos, cefalosporinas de tercera y cuarta generación y carbapenémicos. La resistencia los diferentes antibióticos se explica por cuatro mecanismos de resistencia que posee: 1) Presencia de betalactamasas 2) Cepas mutadas que no presentan porinas 3) Expresión de bombas de flujos o de expulsión 4) Alteración del sitio de unión del antibiótico a la cepa (Barletta Farías *et al.*, 2018), con base a lo anterior se deduce que por alguno de estos mecanismos los compuestos bioactivos producidos por las cepas no fueron activos contra ***A. baumannii***.

De manera general se puede deducir que la actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram negativas no fue tan alta como se esperaba, lo cual se puede justificar por la presencia de una membrana de polisacárido en bacterias Gram negativas la cual funciona como una barrera (Parada *et al.*, 2017).

En cuanto a las cepas aisladas se destacan algunas por poseer un amplio espectro de acción y/o por producir zonas de inhibición con mayor diámetro, entre estas se encuentra la cepa A35 quien mostró un amplio espectro al inhibir ocho patógenos y además de esto presentó zonas de inhibición grandes contra ***S. sonnei*** 28 mm, ***P. alcalifaciens*** 27 mm, ***K. oxytoca*** 23 mm, ***C. albicans*** 16 mm, la cepa A49 presentó un espectro de actividad amplia ya que tuvo actividad frente a nueve patógenos y zonas de inhibición grandes frente a ***K. oxytoca*** de 24 mm, ***P. alcalifaciens*** 17 mm, ***S. saprofiticus*** 16 mm, ***L. monocytogenes*** 15 mm y ***Y. enterocolica*** 14 mm, en este sentido destaco su actividad frente a ***P. alcalifaciens***

ya que solo ocho cepas mostraron actividad frente a este patógeno. Otra cepa que posee un amplio espectro es la cepa A24, la cual logró zonas de inhibición significativas frente a *P. alcalifaciens* 33 mm y fue una de las cepas que presentó actividad frente a *A. baumannii* 15 mm, la cepa A33 tiene actividad frente a siete cepas patógenas, destacando su actividad frente a *S. sonnei* 21 mm, *S. aureus* 19 mm, *C. albicans*, *K. oxytoca* y *S. saprofiticus* con una zona de inhibición de 16 mm, un resultado similar se observa en la cepa A40 la cual posee actividad antimicrobiana frente a siete patógenos, destacándose los halos de inhibición frente a *B. cereus* 19 mm, *K. oxytoca* 17 mm y *S. saprophyticus* 16 mm. La cepa A46 aunque no presentó un espectro amplio, resaltó por las zonas de inhibición contra *C. albicans* 30 mm y *K. oxytoca* 29 mm, mientras que la cepa A03 mostro un amplio espectro pero no generó zonas de inhibición grandes, por último se resalta la actividad de la cepa A28 frente a *A. baumannii* con una zona de inhibición de 16 mm, al ser una de las dos únicas cepas que presentaron actividad frente a este patógeno. Las cepas anteriormente mencionadas son fuentes potenciales de antimicrobianos y valdría la pena ser estudiadas a fondo.

7.2.4. Producción de pigmentos

Las Actinobacterias también se caracterizan por su capacidad para producir pigmentos, en el presente trabajo lograron producir pigmentos amarillos, amarillo-naranja, naranja rojizo, marrones rojizos, marrones y olivas, a simple vista, donde muchos de estas impresiones se confirmaron al observarse picos en las gráficas de barrido correspondientes a cada color amarillo: A07, A09, A10, A12, A13, A16, A21, A27 y A47, en el color marrón se observaban picos en rojo, amarillo, verde, para las cepas A01, A11, A18, A46, A49, A50, A51, y A53 en cuanto a los pigmentos olivas se observaron picos en las zonas del color verde, zona donde se ubicaría dicho pigmento. La importancia de encontrar nuevos pigmentos reincide en que industrias como la alimentaria buscan remplazar los pigmentos sintéticos por naturales, ya que se demostró que los pigmentos sintéticos producen muchos efectos adversos (Carmona, 2013). Con base a estos resultados los pigmentos de color amarillo y naranja podían ser asociados con la producción de carotenoides, ya que algunos géneros como *Actinoplanes* se han asociado con la producción de carotenoides. Los carotenoides son importantes en las dieta ya que muchos de ellos son provitamina A, y se cree que estimulan positivamente el sistema inmune promoviendo la proliferación de linfocitos CD4 y CD8, los cuales son muy bajos en personas con SIDA, además son considerados como compuestos anticancerígenos, ya que muchos tipos de cáncer se asocian con la ausencia de ciertos carotenos en la dieta. Otro pigmento natural importante son las

naftoquinonas las cuales son producidas por bacterias, plantas, hongos e incluso animales, los pigmentos pertenecientes a este grupo pueden ser marrones o naranjas, y se ha demostrado que pueden tener actividad antibacteriana, antiparasitaria, anticancerígena, anti fúngica, entre otras, anteriormente se había demostrado su producción en el género ***Streptomyces*** (Lluvia Itzel López, Leyva, & de la Cruz, 2011), acorde con esto cabe la posibilidad de que las cepas aisladas hayan producido naftoquinonas. Los pigmentos que presentaron una coloración rojiza A14 y A50 se asociaron con un compuesto flavonoide de tipo antocianina tomando como referente las longitudes de onda señaladas en el trabajo desarrollado en 2010 por Castillo y colaboradores, las cuales eran 209, 320 y 523, la relevancia de los pigmentos rojos recae en que la mayoría de colorantes rojos sintéticos están prohibidos por los efectos negativos que puede causar (Castillo, Michelena, & Nogueiras, 2010).

7.2.5. Análisis de los extractos crudos por espectrofotometría

La totalidad de extractos crudos presentaron picos en el espectro UV indicando la presencia de diferentes compuestos, los cuales se pueden asociar con la producción de metabolito secundarios. De manera general se puede decir que en el espectro UV de todas las cepas exceptuando las cepas A49, A07, A22, hipotéticamente presentaron los siguientes enlaces químicos, a 205 nm se observan los grupos de los ácidos carboxílicos y ésteres, en este sentido los picos observados a esta longitud podrían ser correspondientes a cualquiera de estos grupos, posteriormente se observaron picos a 210 nm los cuales indica la presencia de amidas, los picos de absorción comprendidos entre 200 a 220 nm hacen referencia a grupos sulfuros, como es el caso de los tioles que tienen la mayor absorción a 210 nm y a 271 nm se pueden detectar grupos funcionales nitro, los cuales hacen parte de compuestos nitrogenados, pero la presencia de grupos aldehídos no pudo ser determinada, ya no se evaluó el espectro a 180 nm. Además de esto dichas absorbancias también pueden ser relacionadas con diferentes biomoléculas entre las cuales encontramos: el grupo peptídico de la cadena principal de una proteína la cual muestra picos de absorbancia entre 180 a 230 nm, en el rango comprendido entre 230-240 se observan picos de absorbancia correspondientes a cadenas con residuos aromáticos, dicha zona es conocida como ultravioleta cercano o región aromático, al poseer gran cantidad de picos en esta zona los extractos obtenidos se podría inferir que las cepas están produciendo compuestos aromáticos (Arenas Sosa & Lopez Sanchez, 2004). Las cepas A14, A39, A37, A50 presentaron un pico de absorción a 340 nm, el cual es asociado con los grupos diazo ($R-N=N-R$), con base a esto es probable que estas cepas estén generando un compuesto diazo.

En el trabajo realizado por Belgith y colaboradores en 2016, obtuvieron el 2,4-Di-tert-butilfenol, a partir de la cepa ***Streptomyces mutabilis***, dicho compuesto presentó actividad frente a diferentes cepas de ***C. albicans***, este compuesto fue analizado por espectrofotometría, obteniéndose picos en 221, 280 y 288 (Belgith *et al.*, 2016), con base en lo anterior se observó si los gráficos de barrido de las cepas que presentaron actividad frente a ***C. albicans*** poseían dichos picos, determinando tentativamente que las cepas A04, A05, A08, A24, A27, A33, A35, A40, A41, y A46 producían el 2,4-Di-tert-butilfenol ya que presentaron los tres picos. Vineeta y colaboradores en 2018 realizaron un estudio similar al de Belgith, en el que purificaron un compuesto producido por ***Streptomyces levis***, el cual poseía actividad antimicrobiana contra ***K. pneumoniae***, ***P. aeruginosa*** y ***S. aureus***, dicho compuesto presentó picos de 240-250 nm y a 322 nm cuando fue analizado al espectrofotómetro, este compuesto fue identificado como un derivado de cromona disustituido en 2,6 (Singh *et al.*, 2018), en este orden ideas se observó si los espectros de las cepas que poseían actividad contra ***K. oxytoca***, ***P. aeruginosa*** y ***S. aureus*** poseían picos a estas longitudes de onda, estando presentes en las siguientes cepas A09, A27, A29, A31, A32, A35, A37, A38, A40, A41 y A42, por tanto dichas cepas podrían estar produciendo este derivado de cromona disustituido en 2,6.

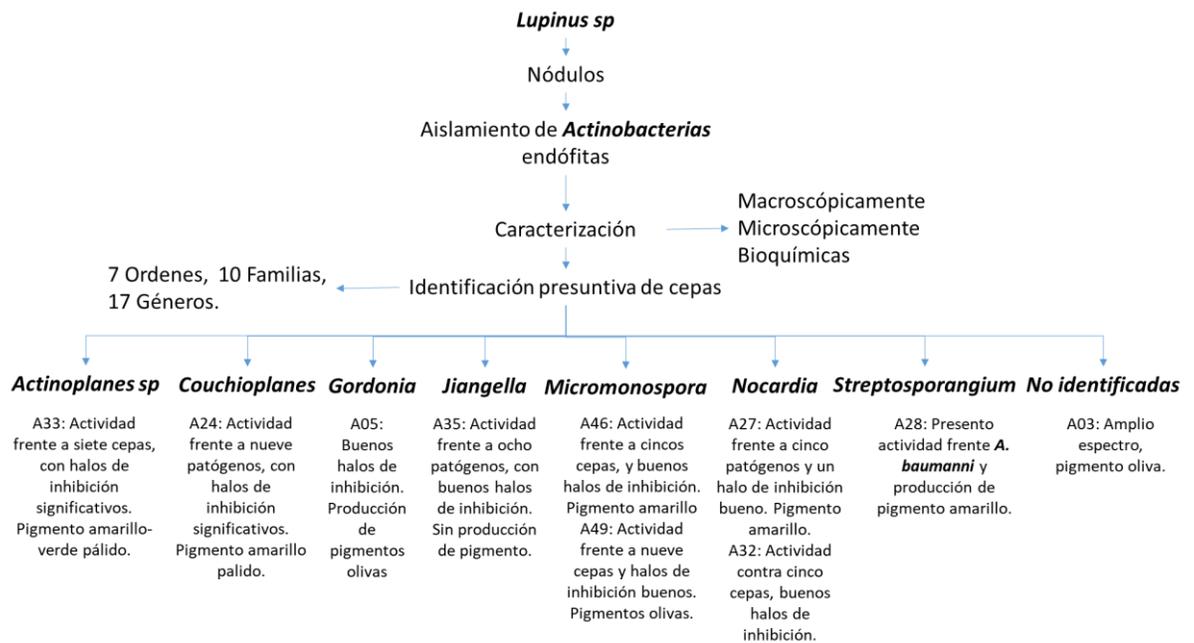
Con base a lo anterior se infiere que en varios de los extractos crudos se encuentran diversos compuestos químicos con diferentes propiedades activas, y tomándolos como referente se podrían escoger algunas de las cepas para realizar análisis de actividad antiparasitaria.

Cabe aclarar que estos compuestos, biomoléculas o grupos químicos pueden estar presentes, pero su presencia debe confirmarse después de purificar el compuesto, a partir de técnicas como cromatografía líquida de alta resolución y espectrofotometría FTIR.

En cuanto al amplio potencial biotecnológico de las cepas, puede ser explicado bajo el concepto de OSMAC (una cepa muchos compuestos), entendiendo que una cepa tiene el potencial de producir diferentes compuestos, pero solo un conjunto de estos se expresa dependiendo de la condiciones ambientales a las cuales se encuentran expuestos, como lo son la fuente de carbono, de nitrógeno, elementos traza, temperaturas, salinidad, pH y condiciones de estrés (Romano, Jackson, Patry, & Dobson, 2018). En este sentido se indica que la producción de antimicrobianos en

algunos de los casos será posible gracias a la condición de estrés que estamos generando, es decir al introducir otro microorganismo al medio ambiente, lo cual activara genes que se encontraban silenciados, con el objetivo de prolongar su existencia.

Para concluir, en el mapa conceptual 1 se destacan algunas de las cepas con mayor potencial biotecnológico y su origen, las cuales podrían ser escogidas para ser analizadas con mayor profundidad posteriormente.



Mapa conceptual 1: Cepas destacadas por los resultados obtenidos de la estimación de su potencial biotecnológico.

8. CONCLUSIONES

- Se aislaron un total de 53 cepas pertenecientes a la clase Actinobacteria, de éstas 40 fueron clasificadas presuntivamente a nivel de género, ubicándose en 17 géneros de 7 órdenes diferentes. El orden con mayor presencia fue Micromonosporales con un 37,72% de las cepas aisladas y el género más frecuente correspondió a **Actinoplanes sp** con un 17,98%.
- Las cepas aisladas y caracterizadas mostraron una buena diversidad, lo cual se evidencia en las múltiples morfologías macro y microscópicamente observadas, así como con el potencial que mostraron para utilizar múltiples fuentes de carbono, producción de ácido, actividad enzimática extracelular, así como la capacidad para desarrollar respiración anaerobia. Dichas características no fueron homogéneas entre las cepas.
- Se observaron cepas con una amplia actividad metabólica, como fue el caso de la cepa A50 que utilizó 13 fuentes de carbono diferentes, generó ácido a partir de cuatro fuentes de carbono, presentó una buena actividad hidrolítica, actividad antimicrobiana y capacidad para producir pigmentos.
- Los ensayos preliminares de actividad antimicrobiana fueron prometedores, ya que el 94,34% de las cepas mostraron alguna actividad, destacándose las cepas A03, A24, A33, A35, A40, y A49 por su amplio espectro antimicrobiano inhibiendo entre siete a nueve patógenos, y seis cepas por su capacidad de inhibición siendo el menor halo de inhibición de 23 mm y el mayor de 33 mm.
- Las cepas A24, A35, y A49 destacaron por poseer un amplio espectro y halos de inhibición significativos, en el caso de A33 presentó actividad frente a ocho patógenos, resaltando la actividad frente a **K. oxytoca** 23 mm, **P. alcalifaciens** 27mm y **S. sonnei** 28, en cuanto a la cepa A24 presentó actividad frente a nueve patógenos, resaltando su actividad frente a **P. alcalifaciens** y por último la cepa A49 presentó actividad frente a nueve patógenos, destacando su actividad frente **K. oxytoca** 24 mm y produjo un pigmento de color oliva.

- Un 81,13% de las cepas presentaron producción de pigmentos en el medio ISP4. El mayor porcentaje de pigmentos correspondió a los tonos amarillos y naranjas con un 50,94%, seguidos por pigmentos de tonos marrones 22,64% y por último pigmentos rojos 3,77%.

9. RECOMENDACIONES O SUGERENCIAS

Se recomienda realizar un análisis molecular con el fin de confirmar la identificación fenotípica, así como también purificar los extractos crudos con el fin de poder obtener moléculas puras y dilucidar su estructura química

10. GLOSARIO

Absorbancia: Cantidad de luz absorbida por la muestra.

Espécimen: Muestra o ejemplar que expresa las características de la población. ,

Espectrofotometría: Método usada para determinar la luz que absorbe un sustancia.

Esporangio: estructura globosa con una membrana peridial simple, que contiene innumerables esporangiosporas.

Esporas: Estructura producida por algunos hongos, protozoos y bacterias. Ciertas bacterias producen esporas como mecanismo de defensa, con paredes gruesas y resistencia a temperaturas altas, humedad y a otras condiciones desfavorables.

Esporóforo: Estructura del micelio que produce y sostiene esporas.

Hifas: Elementos filamentosos específicos.

Microscopía: Métodos utilizados en la investigación que requieren el uso de microscopio

Milímetros: Unidad de longitud.

Nódulos: Asociación simbitica entre planta y bacteria.

BIBLIOGRAFIA

- Aguilera López, J., Vries, E., Espinosa Restrepo, M. T., Henríquez Mendoza, G. M., Marín, V. Y., Pardo Ramos, C., ... Wisner, C. (2017). *Handbook of Spatial Statistics. Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Alós, J.-I. (2014). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>
- Arenas Sosa, I., & Lopez Sanchez, J. L. (2004). *Espectrofotometría de absorción*. Retrieved from http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/espectrometria_de_absorcion.pdf
- Barletta Farías, C. R., Pérez Ponce, L. J., Castro Vega, G., Pujol Pérez, M., Barletta Del Castillo, J. E., & Dueñas Pérez, Y. (2018). Acinetobacter baumannii multirresistente: un reto para la terapéutica actual Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii: a challenge for current therapeutic, 4-05.
- Barney Duran, V. E. (2011). Biodiversidad y ecogeografía del género.
- Belghit, S., Driche, E. H., Bijani, C., Zitouni, A., Sabaou, N., Badji, B., & Mathieu, F. (2016). Activity of 2,4-Di-tert-butylphenol produced by a strain of Streptomyces mutabilis isolated from a Saharan soil against Candida albicans and other pathogenic fungi. *Journal de Mycologie Medicale*, 26(2), 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.03.001>
- Carmona, I. (2013). *De colorantes sintéticos a naturales en la industria alimentaria. Agrimundo, ODEPA, Ministerio de Agricultura Chile* (Vol. Reporte 5).
- Carro, L., Riesco, R., Spröer, C., Trujillo, M. E., Trujillo, M. E., Deutsche, D., & Mikroorganismen, S. Von. (2019). Micromonospora noduli sp. nov. and Micromonospora vinacea sp. nov., isolated from Pisum sativum nodules Printed in Great Britain, (2016), 3509–3514. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001231>
- Carro, L., Spröer, C., Alonso, P., & Trujillo, M. E. (2012). Diversity of Micromonospora strains isolated from nitrogen fixing nodules and rhizosphere of Pisum sativum analyzed by multilocus sequence analysis &. *Systematic and Applied Microbiology*, 35(2), 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.11.003>
- Carro, L., Veyisoglu, A., Riesco, R., Spröer, C., Klenk, H., Sahin, N., & Trujillo, M. E. (2019). Micromonospora phytophila sp. nov. and Micromonospora luteiviridis sp. nov., isolated as natural inhabitants of plant nodules, 248–253. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002490>
- Castillo, G., Michelena, G., & Nogueiras, C. (2010). Caracterización cromatográfica y espectroscópica de pigmento rojo obtenido a partir de Bothrydiplodia theobromae.
- Dholakiya, R. N., Kumar, R., Mishra, A., Mody, K. H., & Jha, B. (2017). Antibacterial and antioxidant activities of novel actinobacteria strain isolated from Gulf of Khambhat, Gujarat. *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02420>
- Escalante, B., Arregui, M., Muñoz, M., & Olivera, S. (2007). Endocarditis nosocomial por Klebsiella oxytoca, 24(10), 563–564.
- Fatahi-Bafghi, M., Rasouli-nasab, M., Yasliani-Fard, S., Habibnia, S., Gharehbaghi, F., Eshraghi, S. S., ... Heidarieh, P. (2018). Diversity and Antimicrobial Activity of Actinomycetes Isolated from Lut Desert: The Extremely Arid Climatic Zones of Iran. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 0(0), 0. <https://doi.org/10.1007/s10989-018-9767-9>
- Fuenzalida, V. G., & Ramos, F. C. (n.d.). AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ACTINOBACTERIAS

DE BIOTECNOLOGÍA, 1–7.

- Ganapathy, A., & Natesan, S. (2018). *Metabolic Potential and Biotechnological Importance of Plant Associated Endophytic Actinobacteria. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Actinobacteria: Diversity and Biotechnological Applications*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63994-3.00014-X>
- Ghodhbane-Gtari, F., Essoussi, I., Chattaoui, M., Chouaia, B., Jaouani, A., Daffonchio, D., ... Gtari, M. (2010). Isolation and characterization of non-Frankia actinobacteria from root nodules of alnus glutinosa, casuarina glauca and elaeagnus angustifolia. *Symbiosis*, 50(1–2), 51–57. <https://doi.org/10.1007/s13199-009-0029-7>
- Golinska, P., Wypij, M., Agarkar, G., Rathod, D., Dahm, H., & Rai, M. (2015). Endophytic actinobacteria of medicinal plants: Diversity and bioactivity. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 108(2), 267–289. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0502-7>
- Goodfellow, M., & Fiedler, H. P. (2010). A guide to successful bioprospecting: Informed by actinobacterial systematics. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 98(2), 119–142. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9460-2>
- Goodfellow, M., Kampf, P., Busse, H., Trujillp, M. E., Suzuki, K., Ludwig, W., & Whitman, W. B. (2012). *Bergey's Manual of Systematics Bacteriology* (Vol. 3, p. 33).
- Guevara, B. L. L. (2017). Aislamiento y caracterización morfológica de cepas nativas de actinomicetos y su actividad antagónica contra Ralstonia solanacearum, Escherichia coli, Staphylococcus aureus y Salmonella sp. *Escuela Agrícola Panamericana*, 30.
- Harir, M., Miloud, B., Zohra, F., García-Arenzana, J. M., Veloso, A., & Rodríguez-Couto, S. (2017). Isolation and Characterization of Actinobacteria from Algerian Sahara Soils with Antimicrobial Activities. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 6(2), 109–120. <https://doi.org/10.22088/acadpub.BUMS.6.2.5>
- Hurtado, J., Pacheco, S. L., Sheen, P., & Ugarte, D. (2018). Actinobacteria Isolated From Mineral Ores in Peru. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 7(3), 366–370. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2018.7.4.366-370>
- Iniyar, A. M., Kannan, R. R., & Vincent, S. G. P. (2017). Characterization of Culturable Actinomycetes Associated with Halophytic Rhizosphere as Potential Source of Antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, 87(1), 233–242. <https://doi.org/10.1007/s40011-015-0601-2>
- Jiang, Z. K., Tuo, L., Huang, D. L., Osterman, I. A., Tyurin, A. P., Liu, S. W., ... Sun, C. H. (2018). Diversity, novelty, and antimicrobial activity of endophytic actinobacteria from mangrove plants in Beilun Estuary National Nature Reserve of Guangxi, China. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAY), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00868>
- Jose, V. L. L., Suzana, C. S. M., Katia, A. de S., Marcos, A. S., & Claudia, M. M. (2017). Characterization of actinobacteria from the semiarid region, and their antagonistic effect on strains of rhizobia. *African Journal of Biotechnology*, 16(11), 499–507. <https://doi.org/10.5897/AJB2016.15724>
- Kim, T. U., Cho, S. H., Han, J. H., Shin, Y. M., Lee, H. B., & Kim, S. B. (2012). Diversity and physiological properties of root endophytic actinobacteria in native herbaceous plants of Korea. *Journal of Microbiology*, 50(1), 50–57. <https://doi.org/10.1007/s12275-012-1417-x>
- Le, X. H., Franco, C. M. M., Ballard, R. A., & Drew, E. A. (2016). Isolation and characterisation of endophytic actinobacteria and their effect on the early growth and nodulation of lucerne (Medicago sativa L.). *Plant and Soil*, 405(1–2), 13–24. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2652-9>

- Lee, L. H., Chan, K. G., Stach, J., Wellington, E. M. H., & Goh, B. H. (2018). Editorial: The search for biological active agent(s) from actinobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAY), 1–4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00824>
- León, J., Aponte, J. J., Cuadra, D. L., Galindo, N., Jaramillo, L., Vallejo, M., & Marguet, E. (2016). Actinomicetos aislados de *Argopecten purpuratus* productores de enzimas extracelulares y con actividad inhibitoria de patógenos marinos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 51(1), 69–80. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572016000100007>
- León, J., Aponte, J. J., Rojas, R., Cuadra, D., Ayala, N., Toms, G., & Guerrero, M. (2011). Estudio de actinomicetos marinos aislados de la costa central del Perú y su actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* metilicina resistentes y *Enterococcus faecalis* vancomicina resistentes. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(2), 237–246.
- Leon, J., Liza, L., Soto, I., Cuadra, D., Patino, L., & Zerpa, R. (2007). Bioactives actinomycetes of marine sediment from the central coast of Peru. *The Peruvian Journal of Biology*, 14(2), 259–270.
- Lluvia Itzel López, L., Leyva, E., & de la Cruz, R. F. G. (2011). Las naftoquinonas: Más que pigmentos naturales. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 42(1), 6–17.
- Martínez Hidalgo, P., Galindo Villardón, P., Trujillo, M. E., M, J., & Martínez Molina, E. (2014). Micromonospora from nitrogen fixing nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). A. <https://doi.org/10.1038/srep06389>
- Martínez, Z. E., Aguilar, E. E. Q., & Enríquez, G. R. (2017). Potencial biotecnológico de las actinobacterias aisladas de suelos de México como fuente natural de moléculas bioactivas: compuestos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas, 21(December), 39–51.
- Mason, C., Cheeptham, N., Riquelme, C., Charlop-Powers, Z., Miller, A. Z., Enes Dapkevicius, M. de L., & Brady, S. (2016). Biotechnological potential of Actinobacteria from Canadian and Azorean volcanic caves. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(2), 843–857. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7932-7>
- Mazutti, M. A., Tres, M. V., Confortin, T. C., Toderó, I., Zobot, G. L., Luft, L., & Soares, J. F. (2018). Importance of *Lupinus albus* in agricultural and food-related areas: A review. *3 Biotech*, 8(10), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1474-x>
- Mingma, R., Pathom-aree, W., Trakulnaleamsai, S., Thamchaipenet, A., & Duangmal, K. (2014). Isolation of rhizospheric and roots endophytic actinomycetes from Leguminosae plant and their activities to inhibit soybean pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *glycine*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(1), 271–280. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1451-9>
- Morvan, A., Moubareck, C., Leclercq, A., Hervé-Bazin, M., Bremont, S., Lecuit, M., ... Le Monnier, A. (2010). Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from humans in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(6), 2728–2731. <https://doi.org/10.1128/AAC.01557-09>
- Ngamwonglumlert, L., Devahastin, S., & Chiewchan, N. (2017). Natural colorants: Pigment stability and extraction yield enhancement via utilization of appropriate pretreatment and extraction methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(15), 3243–3259. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1109498>
- Nie, Y., Wu, Y., Wang, C., Lin, R., Xie, Y., Fang, D., ... Lian, Y. (2018). Structure elucidation and antitumour activity of a new macrolactam produced by marine-derived actinomycete *Micromonospora* sp. FIM05328. *Natural Product Research*, 6419, 1–6. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1366479>
- Nouioui, I., Gueddou, A., Ghodhbane-gtari, F., Rhode, M., Gtari, M., & Klenk, H. (2017). *Frankia*

- asymbiotica sp . nov ., a non-infective actinobacterium isolated from *Morella californica* root nodule, 4897–4901. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002153>
- Nouioui, I., Maria, F. G., Rohde, M. M., Tisa, L. S., & Gtari, M. (2017). *Frankia inefficax* sp . nov ., an actinobacterial endophyte inducing ineffective , non nitrogen-fixing , root nodules on its actinorhizal host plants. *Antonie van Leeuwenhoek*, *110*(3), 313–320. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0801-7>
- Nouioui, I., Montero, C., Faten, C., Gtari, G., Rohde, M., Tisa, L. S., ... Maher, K. (2017). *Frankia discariae* sp . nov .: an infective and effective microsymbiont isolated from the root nodule of *Discaria trinervis*. *Archives of Microbiology*, *0*(0), 0. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1337-6>
- Orden-Martínez, B., Martínez-Ruiz, R., & Millán-Pérez, R. (2008). ¿Qué estamos aprendiendo de *Staphylococcus saprophyticus*? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *26*(8), 495–499. <https://doi.org/10.1157/13127454>
- Parada, R. B., Marguet, E. R., & Vallejo, M. (2017). Aislamiento y caracterización parcial de actinomicetos de suelos con actividad antimicrobiana contra bacterias multidrogo-resistentes Isolation and partial characterization of soils actinomycetes with antimicrobial activity against multidrug-resistant bac. *Revista Colombiana Biotecnología*, *XIX*(2), 15–23. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.64098>
- Pathalam, G., Rajendran, H. A. D., Appadurai, D. R., Gandhi, M. R., Michael, G. P., Savarimuthu, I., & Naif, A. A.-D. (2017). Isolation and molecular characterization of actinomycetes with antimicrobial and mosquito larvicidal properties. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, *6*(2), 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2017.04.002>
- Pokharel, A., Mirza, B. S., & Dawson, J. O. (2011). *Frankia* Populations in Soil and Root Nodules of Sympatrically Grown *Alnus* Taxa, 92–100. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9726-2>
- Qin, S., Li, J., Chen, H. H., Zhao, G. Z., Zhu, W. Y., Jiang, C. L., ... Li, W. J. (2009). Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna China. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(19), 6176–6186. <https://doi.org/10.1128/AEM.01034-09>
- Qin, S., Xing, K., Jiang, J., & Xu, L. (2011). Biodiversity , bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria, 457–473. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2923-6>
- Rateb, M. E., Ebel, R., & Jaspars, M. (2018). Natural product diversity of actinobacteria in the Atacama Desert. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, *111*(8), 1467–1477. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1030-z>
- Revollo, E., Serna, O., & Hernández, J. (2012). Caracterización de actinobacterias raras, degradadoras de lignocelulosa: Demostración de actividad lacasa en dos aislados de *Tsukamurella* sp y *Cellulosimicrobium* sp. *Rev. Colomb. Biotecnol.*, *14*(2), 70–80.
- Roca, B., Ferrer, D., & Perez, A. (2005). Absceso hepático por *Klebsiella oxytoca*, 22, 2005.
- Rodríguez, R. (2008). ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN BACTERIANA ENDOFITA PRESENTE EN NÓDULOS DE *Lupinus*: INTERACCIÓN Y LOCALIZACIÓN IN SITU.
- Romano, S., Jackson, S. A., Patry, S., & Dobson, A. D. W. (2018). Extending the “one strain many compounds” (OSMAC) principle to marine microorganisms. *Marine Drugs*, *16*(7), 1–29. <https://doi.org/10.3390/md16070244>
- Salam, N., Khieu, T. N., Liu, M. J., Vu, T. T., Chu-Ky, S., Quach, N. T., ... Li, W. J. (2017). Endophytic Actinobacteria associated with *Dracaena cochinchinensis* Lour.: Isolation, diversity, and their cytotoxic activities. *BioMed Research International*, 2017.

<https://doi.org/10.1155/2017/1308563>

- Sarmiento-vizca, A., Braña, A. F., Ignacio, P., Pedro, N. De, Cruz, M. De, Caridad, D., ... Blanco, G. (2017). Paulomycin G, a New Natural Product with Cytotoxic Activity against Tumor Cell Lines Produced by Deep-Sea Sediment Derived Micromonospora matsumotoense M-412 from the Avilés Canyon in the. <https://doi.org/10.3390/md15090271>
- Singh, V., Haque, S., Khare, S., Tiwari, A. K., Katiyar, D., Banerjee, B., ... Tripathi, C. K. M. (2018). Isolation and purification of antibacterial compound from streptomyces levis collected from soil sample of north India. *PLoS ONE*, *13*(7), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200500>
- Sr, S. K., & Rao, K. V. B. (2012). In-vitro antimicrobial activity of marine actinobacteria against multidrug resistance Staphylococcus aureus. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *2*(10), 787–792. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60230-5](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60230-5)
- Srivastava, V., & Dubey, A. K. (2016). Anti-biofilm activity of the metabolites of Streptomyces chrestomyceticus strain ADP4 against Candida albicans. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *122*(4), 434–440. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.03.013>
- Stroble, G., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Avian Diseases*, *67*(4), 491–502. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.491>
- Tarazona, U., Jorge, L., Nadia, G., Vallejo, M., & Marguet, E. (2017). Caracterización de actinomicetos de sedimento marino y su potencial actividad antagonista frente a Vibrio sp. aislados de Litopenaeus vannamei, *29*(2), 676–691.
- Tekaya, S. Ben, Guerra, T., Rodriguez, D., Dawson, J. O., Marcos, S., & Hahn, D. (2017). Frankia diversity in host-plant root nodules is independent of abundance or relative diversity of Frankia in corresponding rhizosphere soils Downloaded from <http://aem.asm.org/> on December 15, 2017 by FUDAN UNIVERSITY Frankia diversity in host-plant root, *78666*(December). <https://doi.org/10.1128/AEM.02248-17>
- Torres, O. D., & Velho, L. (2009). Capacidades científicas y tecnológicas de Colombia para adelantar prácticas de bioprospección. *Revista Iberoamericana de Ciencia Tecnología y Sociedad*, *4*(12), 55–68. Retrieved from http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1850-00132009000100004&lang=pt
- Trujillo, M. E. (2013). Micromonospora halotolerans sp. nov., isolated from the rhizosphere of a Pisum sativum plant, 1245–1254. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9903-7>
- Trujillo, M. E., Alonso-Vega, P., Rodríguez, R., Carro, L., Cerda, E., Alonso, P., & Martínez-Molina, E. (2010). The genus Micromonospora is widespread in legume root nodules: The example of Lupinus angustifolius. *ISME Journal*, *4*(10), 1265–1281. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.55>
- Trujillo, M. E., Kroppenstedt, R. M., Schumann, P., & Marti, E. (2006). Kribbella lupini sp. nov., isolated from the roots of Lupinus angustifolius, 407–411. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63745-0>
- Wei, G., Shi, P., Shi, P., Liu, D., Yang, B., Li, M., & Wei, G. (2015). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology Microbacterium shaanxiense sp. nov., isolated from the nodule surface of soybean Microbacterium shaanxiense sp. nov., isolated from the nodule surface of soybean. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000116>
- Wei, W., Zhou, Y., Chen, F., Yan, X., Lai, Y., Wei, C., ... Wang, X. (2018). Isolation, diversity, and antimicrobial and immunomodulatory activities of endophytic actinobacteria from tea cultivars Zijuan and Yunkang-10 (Camellia sinensis var. assamica). *Frontiers in Microbiology*, *9*(JUN), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01304>

ANEXOS

Anexo 1: Composición de medios

YMA	Avena	YSA	ISP1-M
20 g/L agar 10 g/L manitol 3g/L extracto de levadura 0,2 g/L K ₂ HPO ₄ 0,2g/L MgSO ₄	20 g/L agar 10 g/L avena en ojelos 10 g/L avena en harina	20 g/L agar 10 g/L almidón 3g/L extracto de levadura 0,2 g/L K ₂ HPO ₄ 0,2g/L MgSO ₄	20 g/L agar 5 g/L triptona 2,5 g/L NaCl 3 g/L Extractos de levadura 0,2 g/L K ₂ HPO ₄ 1 ml/L solución de sales traza 1
ISP2-M	ISP4	Solución de sales traza	Medio mínimo (utilización fuentes de carbono)
20 g/L agar 20 4g/L extracto de levadura 10 g/L extracto de malta 4 g/L Dextrosa 1 ml/L Solución de sales traza	Solución 1: 10 g de almidón soluble en 500 ml de agua solución 2: 3 g Extracto de levadura 1 g K ₂ HPO ₄ 1 g MgSO ₄ *7 H ₂ O 1 g NaCl 2 g CaCO ₃ 1 ml de solución de sales traza 20 g de agar-agar en 500 mL de agua destilada	0,64 g/0,1L CuSO ₄ * 5H ₂ O 0,11 g/0,1L FeSO ₄ * 7H ₂ O 0,72 g/0,1L MnCl ₂ * 4H ₂ O 0,15 g/0,1L ZnSO ₄ * 7H ₂ O	2,64 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ 2,38 g/L KH ₂ PO ₄ 5,65 g/L K ₂ HPO ₄ 1 g/L MgSO ₄ *7H ₂ O, 1 mL de solución de sales traza 20 g/L agar
Medio mínimo (producción de ácido)	Agar urea	SA1	Solución de mercurio acido
2,64 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ 1 g/L MgSO ₄ *7H ₂ O, 1 mL de solución de sales traza 10 g/L fuente de carbono, 2 ml/L de purpura de bromocresol al 1% 20 g/L agar Y se tituló con NaOH 0,5 N	1g/100 mL Peptona 1 g/100 mL Glucosa 5 g/100mL Cloruro de sodio 1,2 g/100mL Na ₂ HPO ₄ 0,8 g/100mL KH ₂ PO ₄	1g/L Glucosa 3 g/L extracto de levadura 5 g/L triptona 10 g/L almidón 0,1 g/L CaCO ₃ , trazas de CaCl ₂ y Citrato férrico 20 g/L agar-agar	HgCl ₂ 15g HCl concentrado 20 ml 100 ml H ₂ O _D

	0,012 g/100L rojo fenol 2,5 mL/100 mL urea 15 g/100 mL Agar		
Nitratos			
5g/L Peptona 3 g/L extracto de carne 1 g/L KNO ₃ 5 g/L glucosa 3 g/L agar			

Anexo 2: Tabla de colores

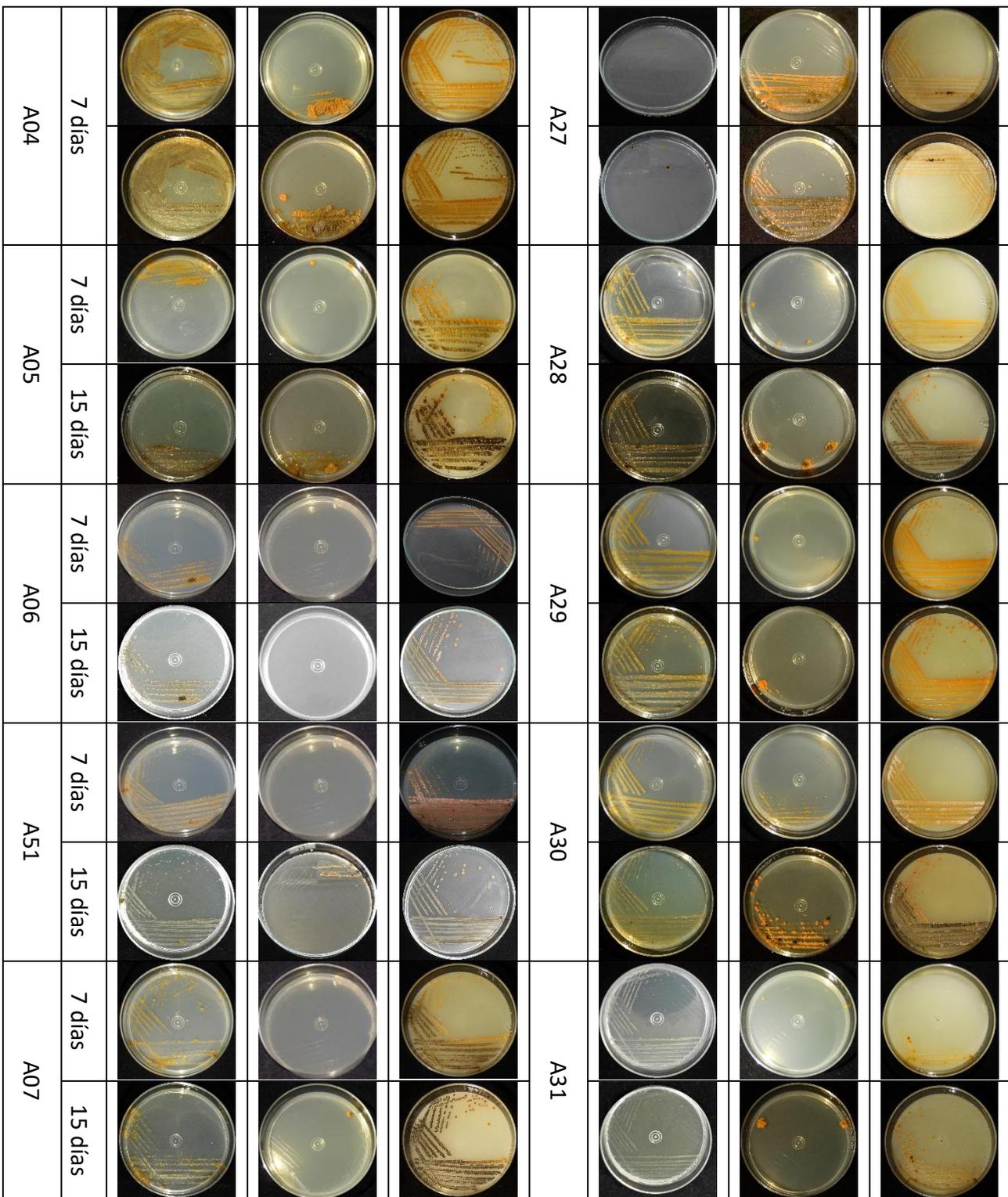
1	Vivid pink	253,121,146	51	Deep orange	194,96,18
2	Strong pink	244,143,160	52	Light orange	251,175,130
3	Deep pink	230,105,128	53	Moderate orange	222,141,92
4	Light pink	248,195,206	54	Brownish orange	178,102,51
5	Moderate pink	226,163,174	55	Strong brown	138,68,22
6	Dark pink	197,128,138	56	Deep brown	87,26,7
7	Pale pink	239,209,220	57	Light brown	173,124,99
8	Grayish pink	203,173,183	58	Moderate brown	114,74,56
9	Pinkish white	239,221,229	59	Dark brown	68,33,18
10	Pinkish gray	199,182,189	60	Light grayish brown	153,127,117
11	Vivid red	213,28,60	61	Grayish brown	103,79,72
12	Strong red	191,52,75	62	Dark grayish brown	62,44,40
13	Deep red	135,18,45	63	Light brownish gray	146,130,129
14	Very deep red	92,6,37	64	Brownish gray	96,82,81
15	Moderate red	177,73,85	65	Brownish black	43,33,30
16	Dark red	116,36,52	66	Vivid orange yellow	NaN,NaN,NaN
17	Very dark red	72,17,39	67	Brilliant orange yellow	255,190,80
18	Light grayish red	180,136,141	68	Strong orange yellow	240,161,33
19	Grayish red	152,93,98	69	Deep orange yellow	208,133,17
20	Dark grayish red	83,56,62	70	Light orange yellow	252,194,124
21	Blackish red	51,33,39	71	Moderate orange yellow	231,167,93
22	Reddish gray	146,129,134	72	Dark orange yellow	195,134,57
23	Dark reddish gray	93,78,83	73	Pale orange yellow	238,198,166
24	Reddish black	48,38,43	74	Strong yellowish brown	158,103,29
25	Vivid yellowish pink	253,126,93	75	Deep yellowish brown	103,63,11
26	Strong yellowish pink	245,144,128	76	Light yellowish brown	196,154,116
27	Deep yellowish pink	239,99,102	77	Moderate yellowish brown	136,102,72
28	Light yellowish pink	248,196,182	78	Dark yellowish brown	80,52,26
29	Moderate yellowish pink	226,166,152	79	Light grayish yellowish brown	180,155,141
30	Dark yellowish pink	201,128,126	80	Grayish yellowish brown	126,105,93
31	Pale yellowish pink	241,211,209	81	Dark grayish yellowish brown	77,61,51
32	Grayish yellowish pink	203,172,172	82	Vivid yellow	241,191,21
33	Brownish pink	203,175,167	83	Brilliant yellow	247,206,80
34	Vivid reddish orange	232,59,27	84	Strong yellow	217,174,47
35	Strong reddish orange	219,93,59	85	Deep yellow	184,143,22
36	Deep reddish orange	175,51,24	86	Light yellow	244,210,132
37	Moderate reddish orange	205,105,82	87	Moderate yellow	210,175,99
38	Dark reddish orange	162,64,43	88	Dark yellow	176,143,66
39	Grayish reddish orange	185,117,101	89	Pale yellow	239,215,178
40	Strong reddish brown	139,28,14	90	Grayish yellow	200,177,139
41	Deep reddish brown	97,15,18	91	Dark grayish yellow	169,144,102
42	Light reddish brown	172,122,115	92	Yellowish white	238,223,218
43	Moderate reddish brown	125,66,59	93	Yellowish gray	198,185,177
44	Dark reddish brown	70,29,30	94	Light olive brown	153,119,54
45	Light grayish reddish brown	158,127,122	95	Moderate olive brown	112,84,32
46	Grayish reddish brown	108,77,75	96	Dark olive brown	63,44,16
47	Dark grayish reddish brown	67,41,42	97	Vivid greenish yellow	235,221,33
48	Vivid orange	247,118,11	98	Brilliant greenish yellow	233,220,85
49	Brilliant orange	NaN,NaN,NaN	99	Strong greenish yellow	196,184,39
50	Strong orange	234,129,39	100	Deep greenish yellow	162,152,18

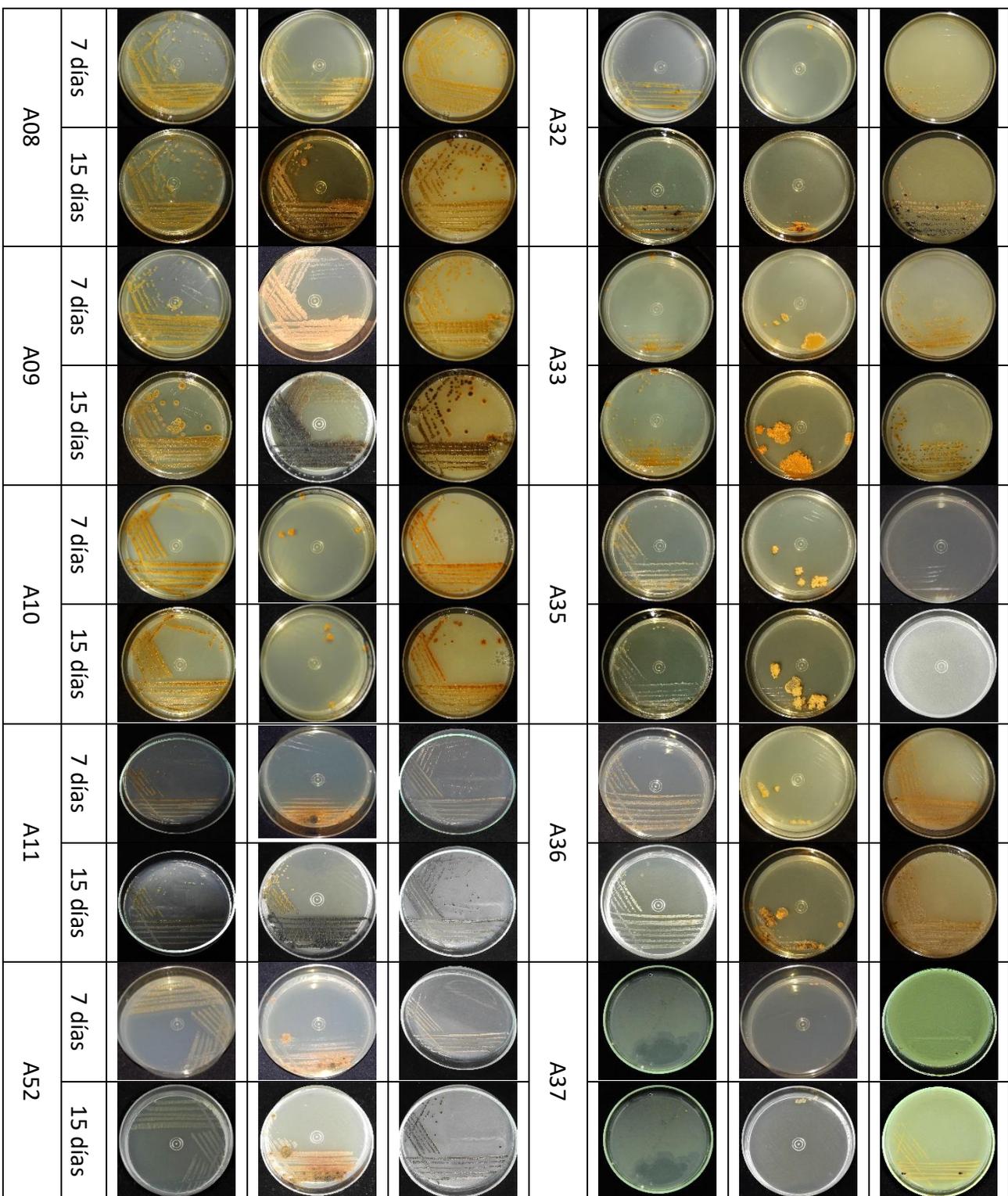
Anexo 2: Tabla de colores

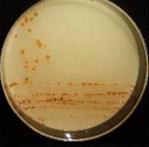
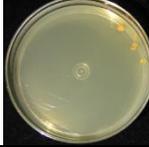
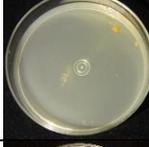
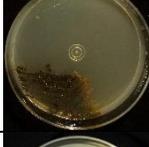
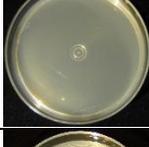
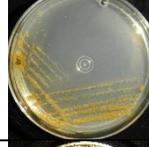
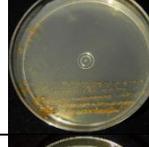
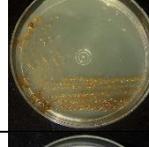
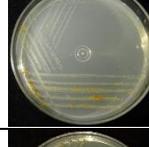
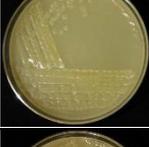
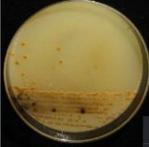
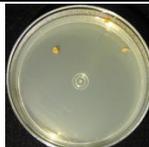
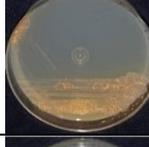
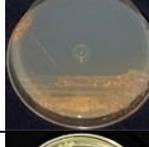
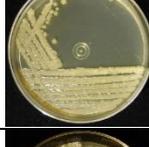
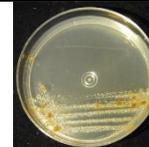
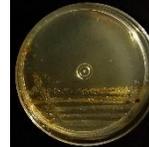
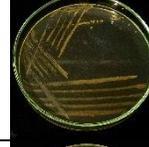
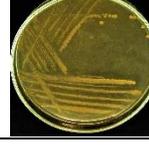
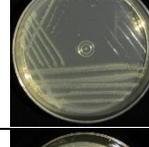
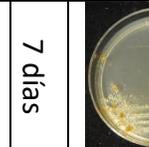
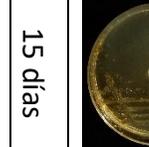
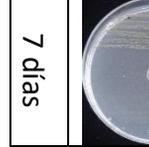
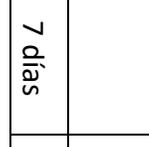
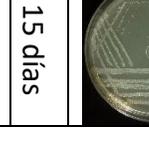
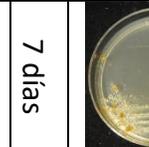
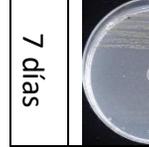
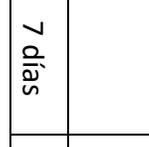
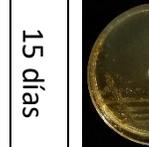
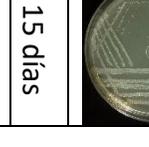
101	Light greenish yellow	233,221,138	151	Dark grayish green	57,71,70
102	Moderate greenish yellow	192,181,94	152	Blackish green	31,42,42
103	Dark greenish yellow	158,149,60	153	Greenish white	224,226,229
104	Pale greenish yellow	230,220,171	154	Light greenish gray	186,190,193
105	Grayish greenish yellow	190,181,132	155	Greenish gray	132,136,136
106	Light olive	139,125,46	156	Dark greenish gray	84,88,88
107	Moderate olive	100,89,26	157	Greenish black	33,38,38
108	Dark olive	53,46,10	158	Vivid bluish green	19,252,213
109	Light grayish olive	142,133,111	159	Brilliant bluish green	53,215,206
110	Grayish olive	93,85,63	160	Strong bluish green	13,143,130
111	Dark grayish olive	53,48,28	161	Deep bluish green	NaN,NaN,NaN
112	Light olive gray	143,135,127	162	Very light bluish green	152,225,224
113	Olive gray	88,81,74	163	Light bluish green	95,171,171
114	Olive black	35,33,28	164	Moderate bluish green	41,122,123
115	Vivid yellow green	167,220,38	165	Dark bluish green	21,75,77
116	Brilliant yellow green	195,223,105	166	Very dark bluish green	10,45,46
117	Strong yellow green	130,161,43	167	Vivid greenish blue	NaN,NaN,NaN
118	Deep yellow green	72,108,14	168	Brilliant greenish blue	45,188,226
119	Light yellow green	206,219,159	169	Strong greenish blue	19,133,175
120	Moderate yellow green	139,154,95	170	Deep greenish blue	NaN,NaN,NaN
121	Pale yellow green	215,215,193	171	Very light greenish blue	148,214,239
122	Grayish yellow green	151,154,133	172	Light greenish blue	101,168,195
123	Strong olive green	44,85,6	173	Moderate greenish blue	42,118,145
124	Deep olive green	NaN,NaN,NaN	174	Dark greenish blue	19,74,96
125	Moderate olive green	73,91,34	175	Very dark greenish blue	11,44,59
126	Dark olive green	32,52,11	176	Vivid blue	27,92,215
127	Grayish olive green	84,89,71	177	Brilliant blue	65,157,237
128	Dark grayish olive green	47,51,38	178	Strong blue	39,108,189
129	Vivid yellowish green	63,215,64	179	Deep blue	17,48,116
130	Brilliant yellowish green	135,217,137	180	Very light blue	153,198,249
131	Strong yellowish green	57,150,74	181	Light blue	115,164,220
132	Deep yellowish green	23,106,30	182	Moderate blue	52,104,158
133	Very deep yellowish green	5,66,8	183	Dark blue	23,52,89
134	Very light yellowish green	197,237,196	184	Very pale blue	194,210,236
135	Light yellowish green	156,198,156	185	Pale blue	145,162,187
136	Moderate yellowish green	102,144,105	186	Grayish blue	84,104,127
137	Dark yellowish green	47,93,58	187	Dark grayish blue	50,63,78
138	Very dark yellowish green	16,54,26	188	Blackish blue	30,37,49
139	Vivid green	35,234,165	189	Bluish white	225,225,241
140	Brilliant green	73,208,163	190	Light bluish gray	183,184,198
141	Strong green	21,138,102	191	Bluish gray	131,135,147
142	Deep green	NaN,NaN,NaN	192	Dark bluish gray	80,84,95
143	Very light green	166,226,202	193	Bluish black	36,39,46
144	Light green	111,172,149	194	Vivid purplish blue	68,54,209
145	Moderate green	51,119,98	195	Brilliant purplish blue	128,136,226
146	Dark green	22,78,61	196	Strong purplish blue	83,89,181
147	Very dark green	12,46,36	197	Deep purplish blue	42,40,111

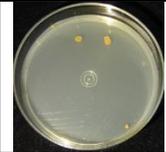
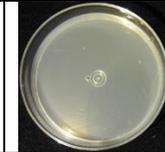
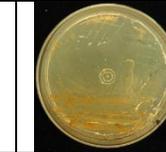
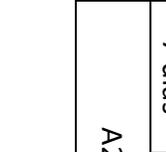
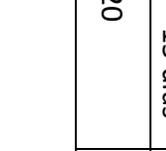
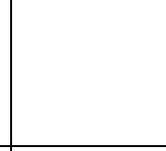
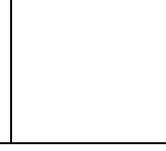
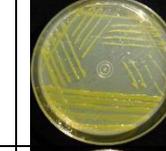
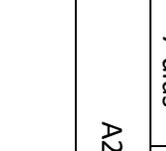
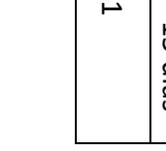
Anexo 3: Cepas en aisladas de nódulos radiculares en diferentes medios

CEPAS		ISP 1	ISP 2	ISP 4		ISP1	ISP2	ISP4
A01	7 días				A22			
	15 días							
A02	7 días				A23			
	15 días							
A03-1	7 días				A24			
	15 días							
A49	7 días				A25			
	15 días							
A50	7 días				A26			
	15 días							



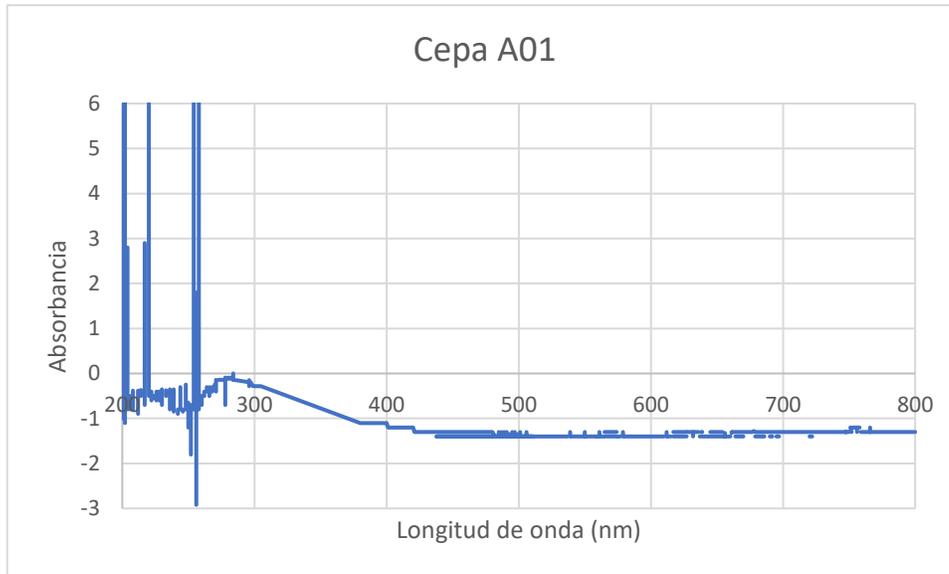


										
										
										
A43										
A43										
										
										
7 días										
A17										
A17										

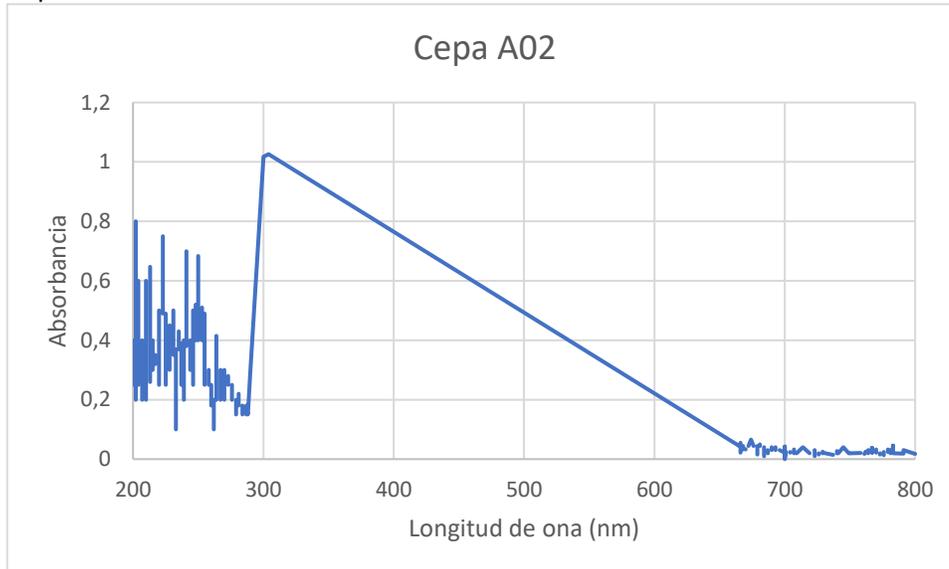
				
				
				
A48				
				
				
				
				
7 días				
15 días				
A20				
				
				
				
				
				
				
				
7 días				
15 días				
A21				

Anexo 4: Gráficas del análisis espectrofotométrico del extracto crudo

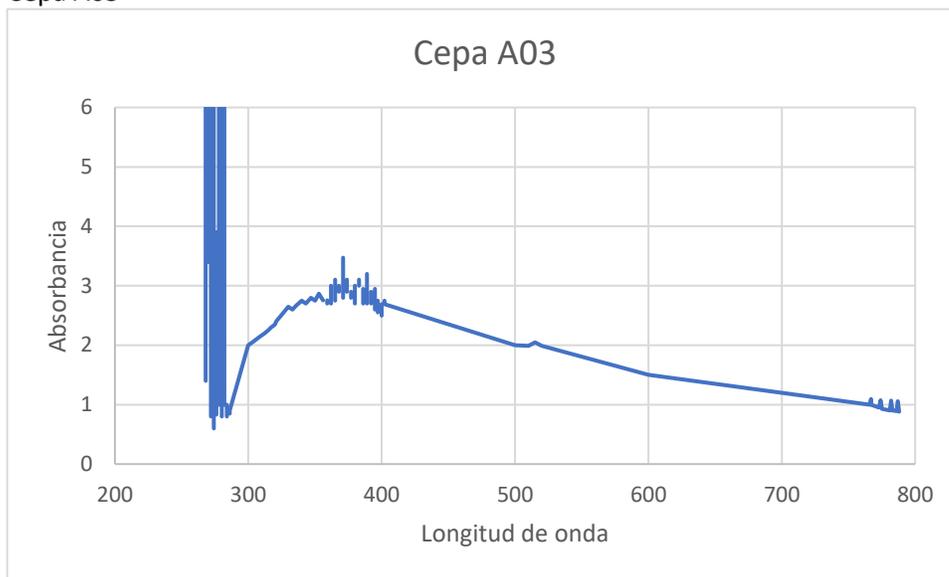
CEPA A01



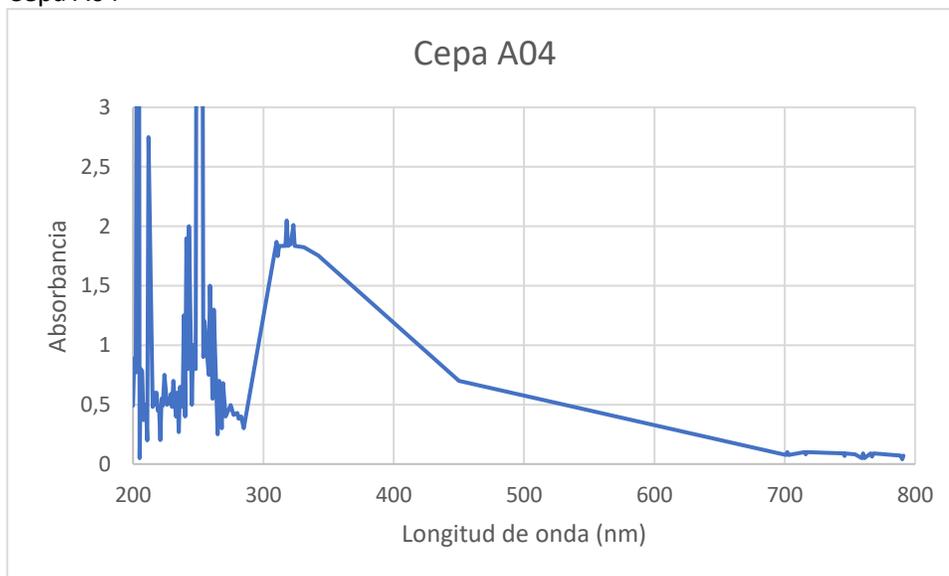
Ceba A02



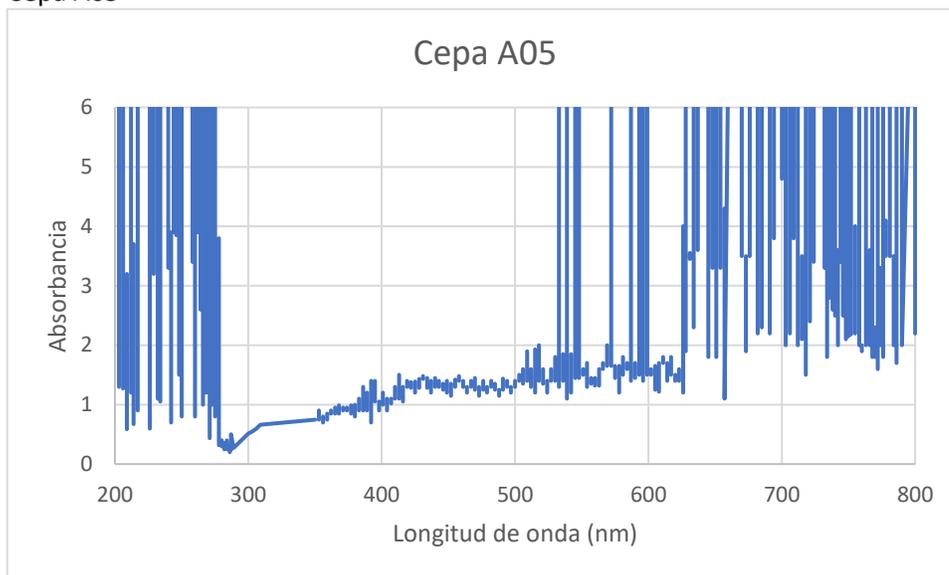
Cepa A03



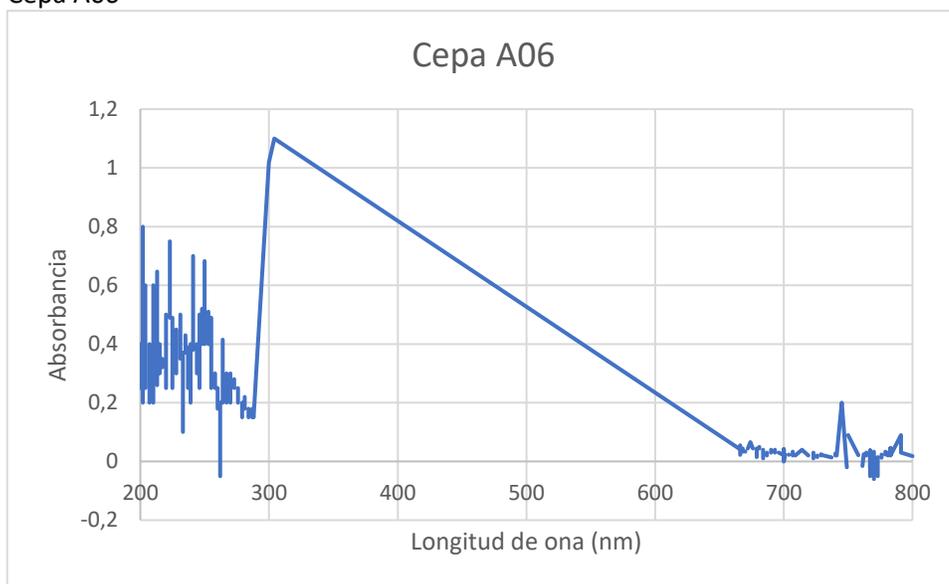
Cepa A04



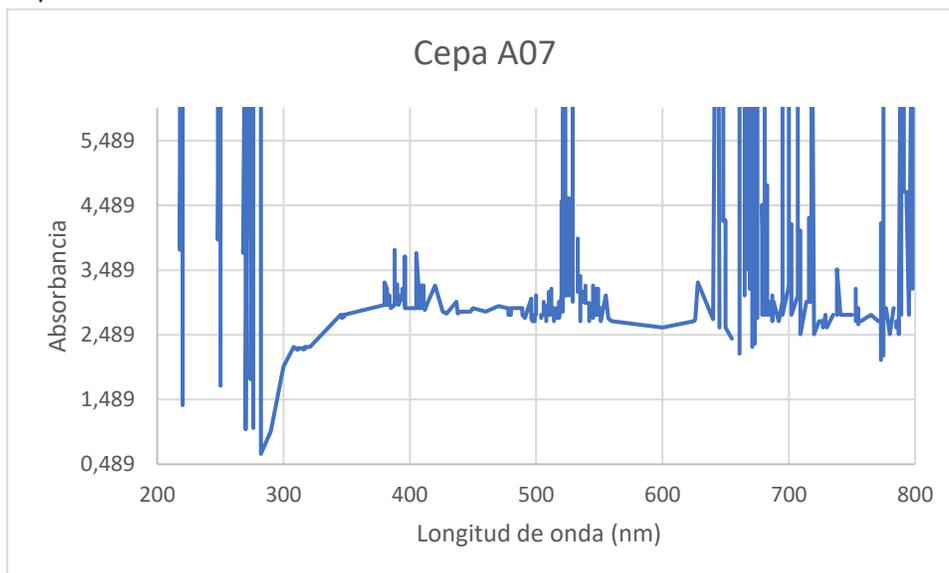
Cepa A05



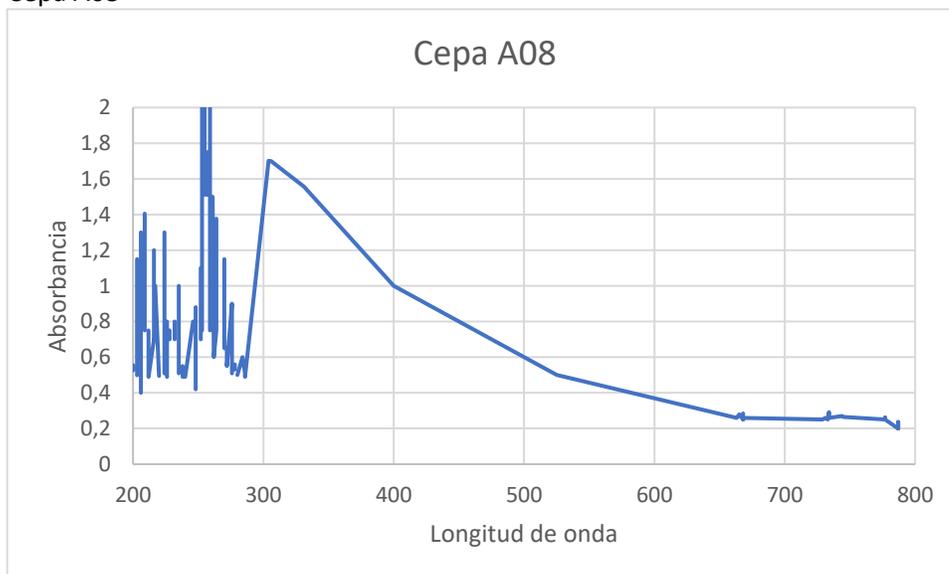
Cepa A06



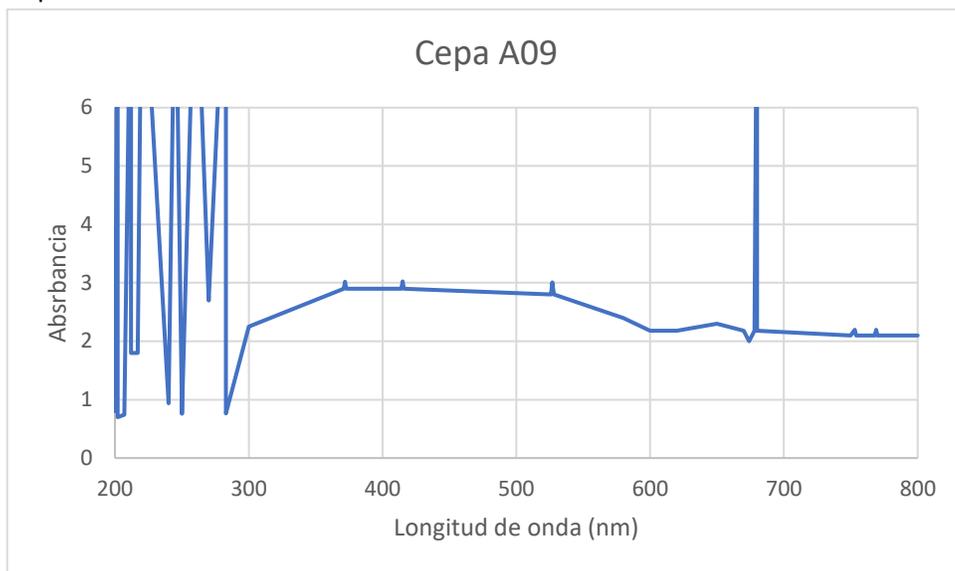
Cepa A07



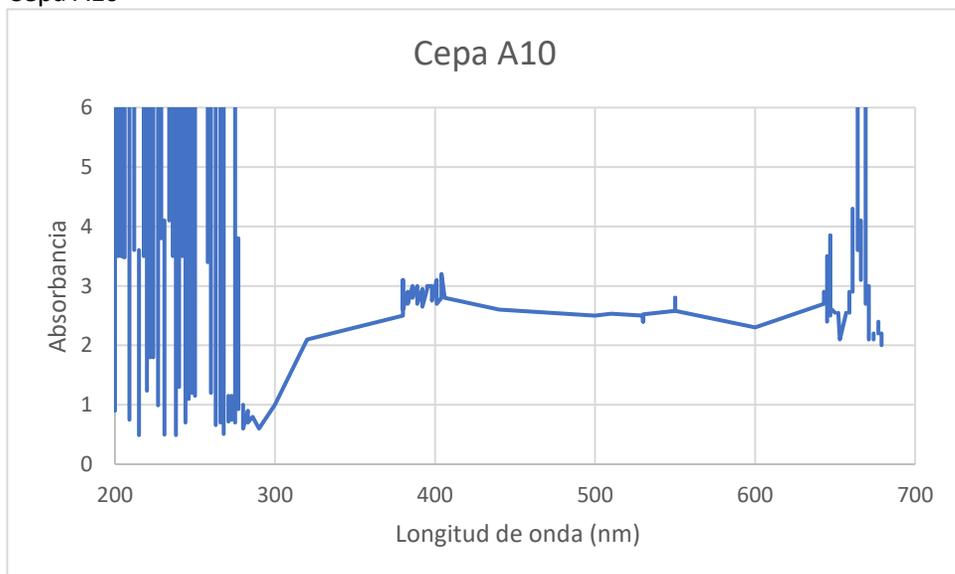
Cepa A08



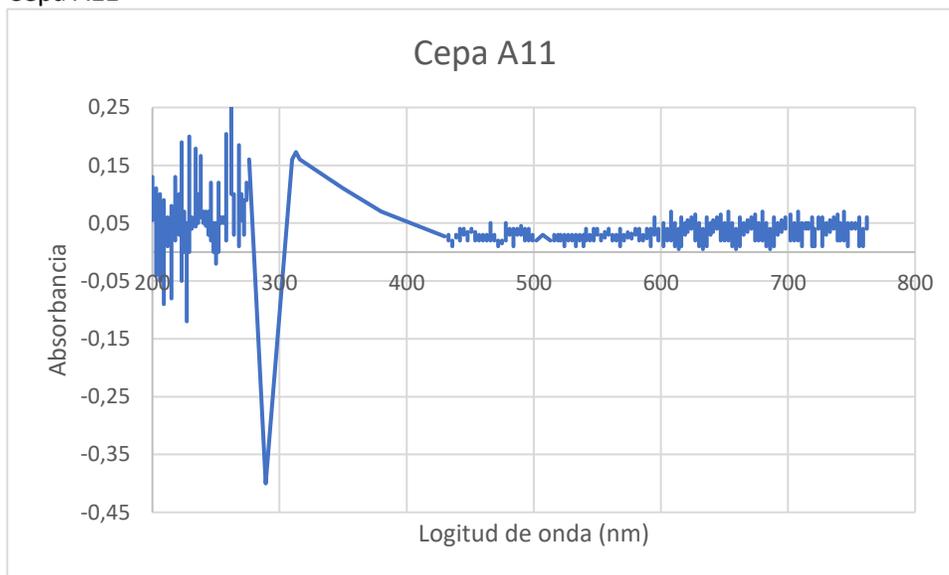
Cepa A09



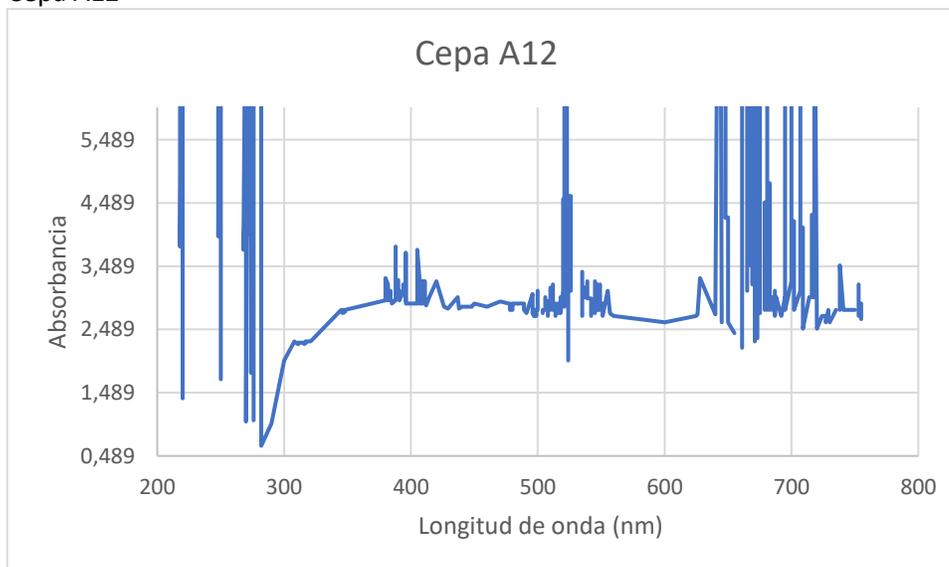
Cepa A10



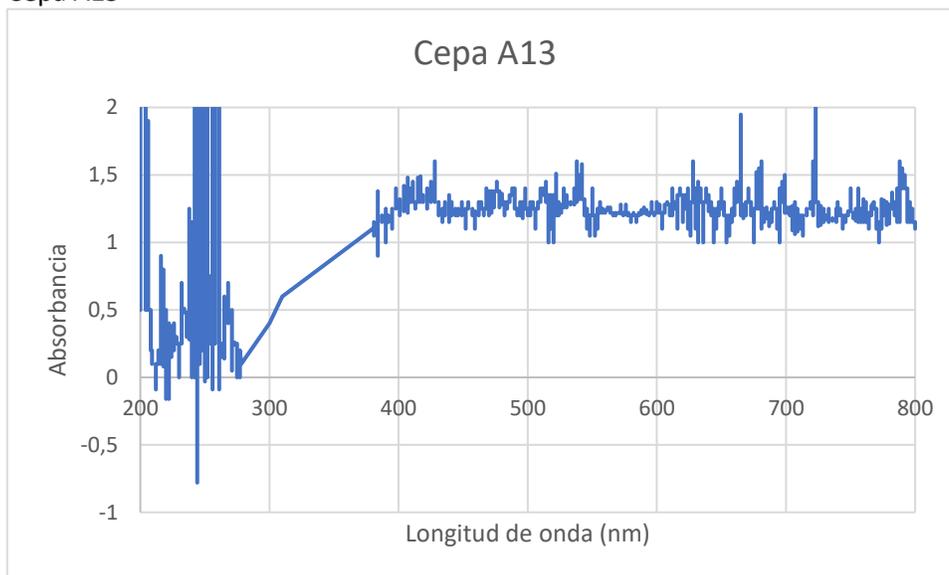
Cepa A11



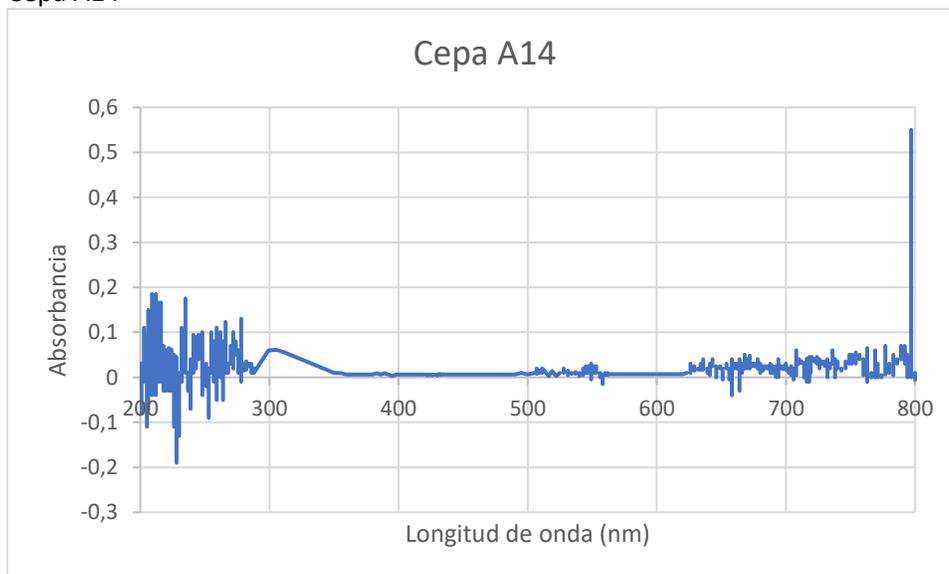
Cepa A12



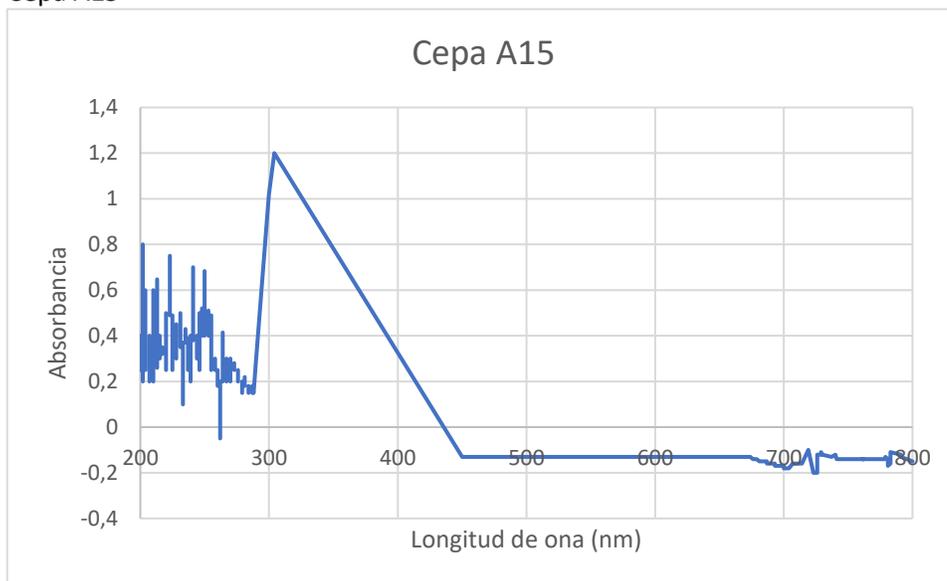
Cepa A13



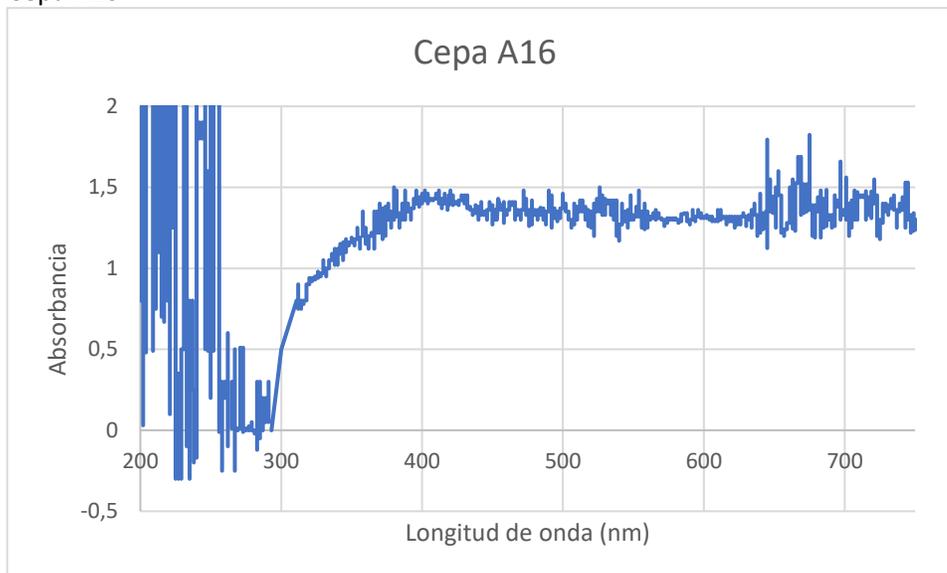
Cepa A14



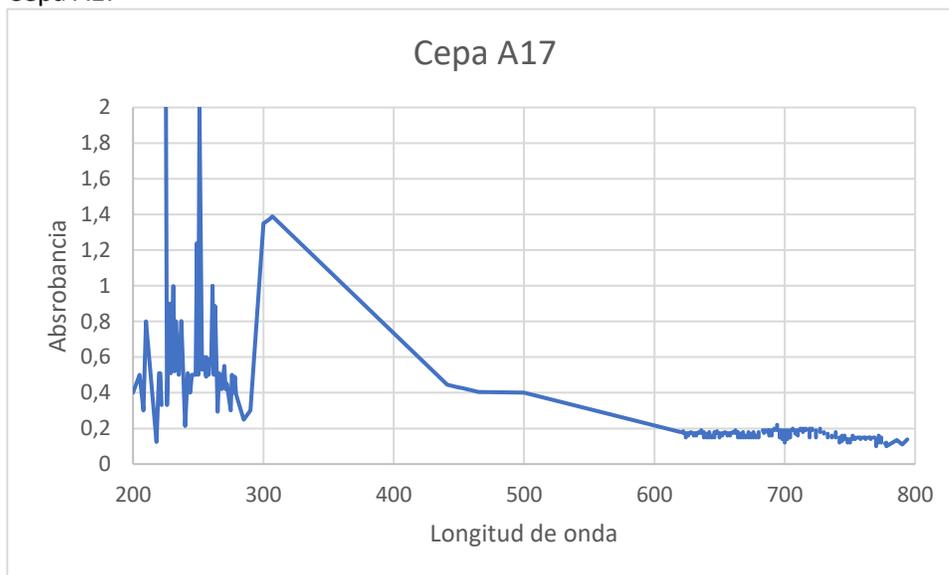
Cepa A15



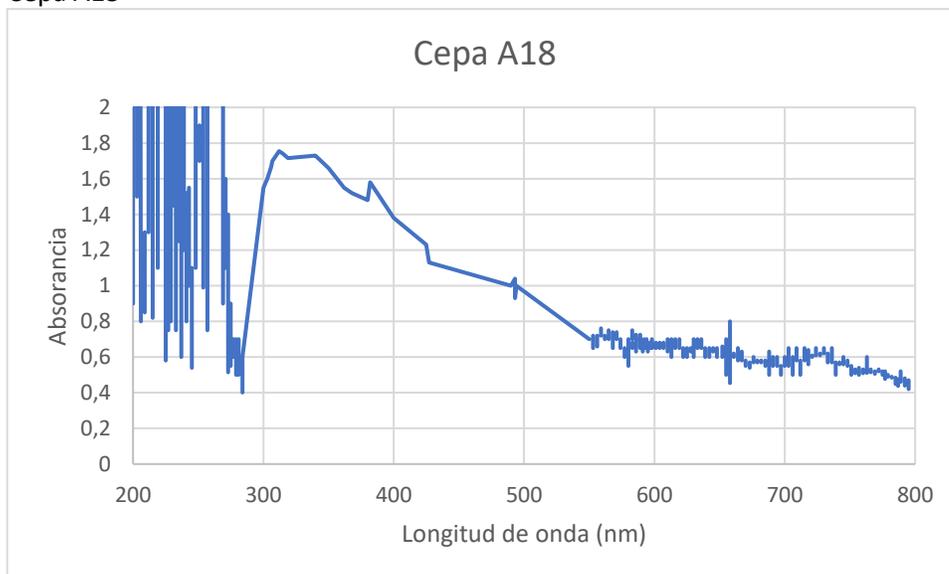
Cepa A16



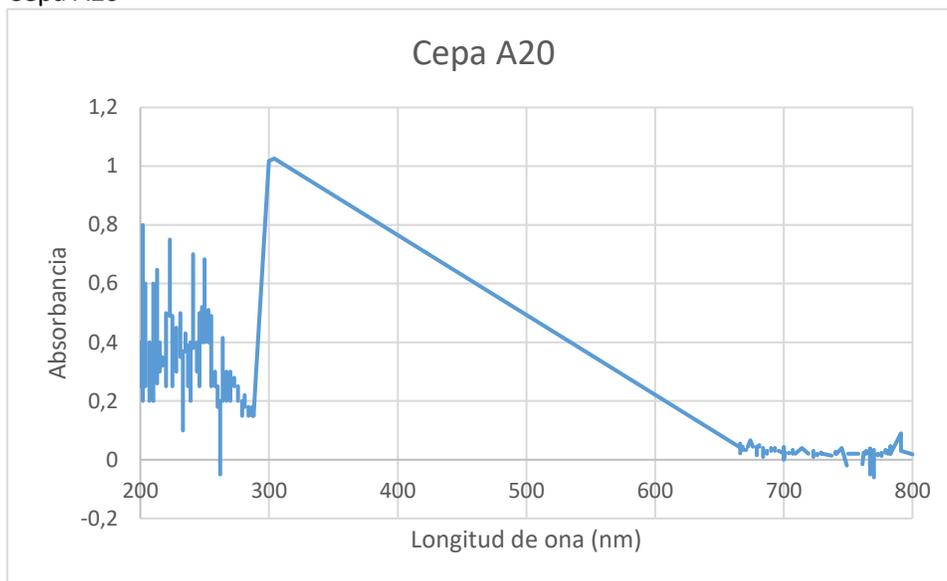
Cepa A17



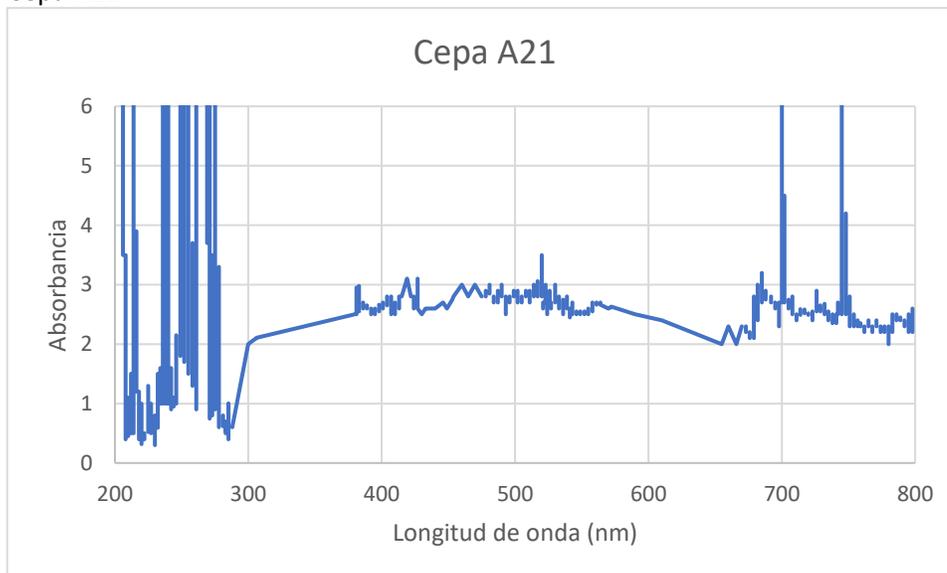
Cepa A18



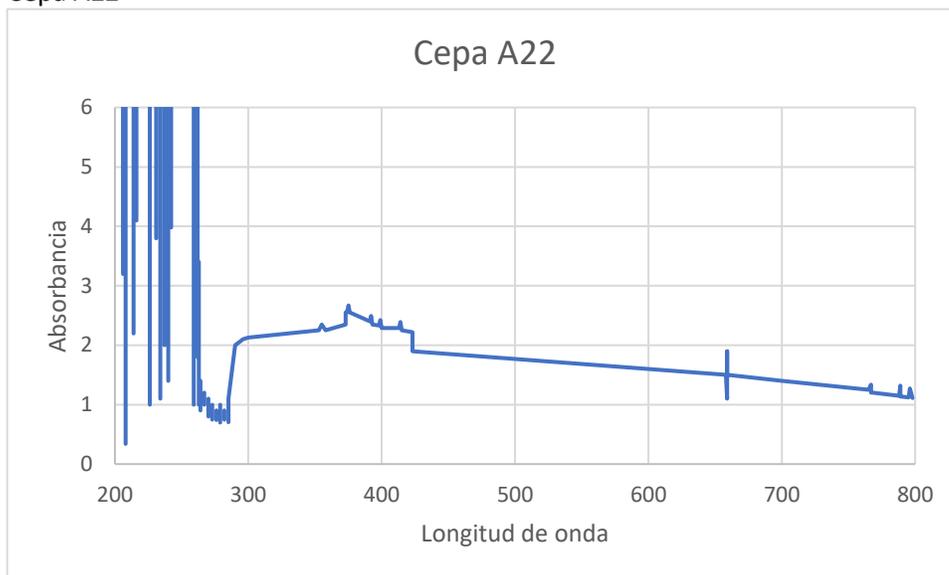
Cepa A20



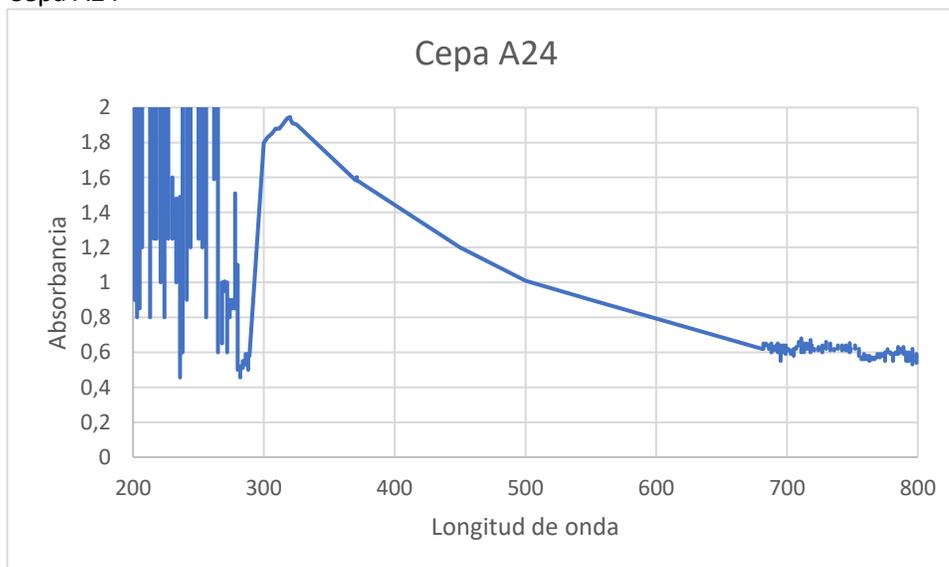
Cepa A21



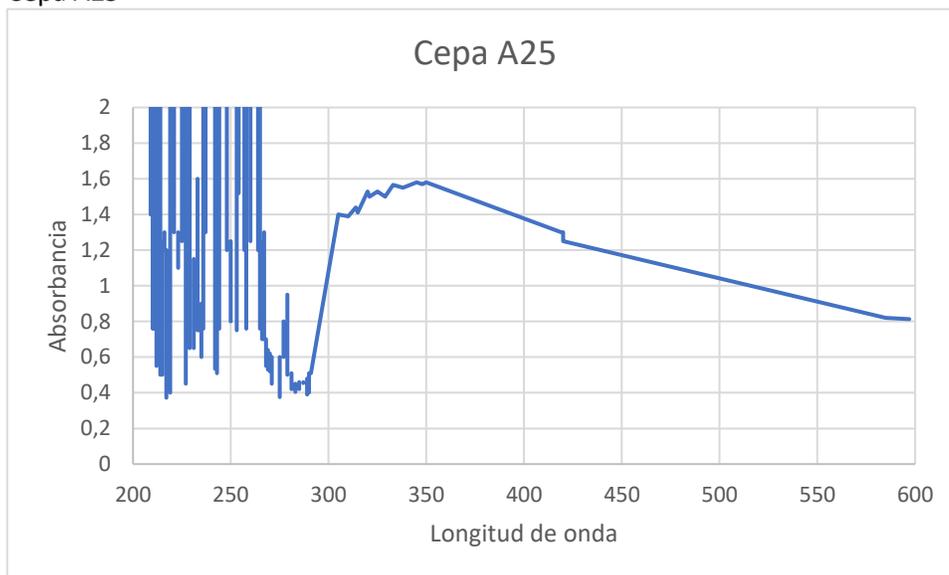
Cepa A22



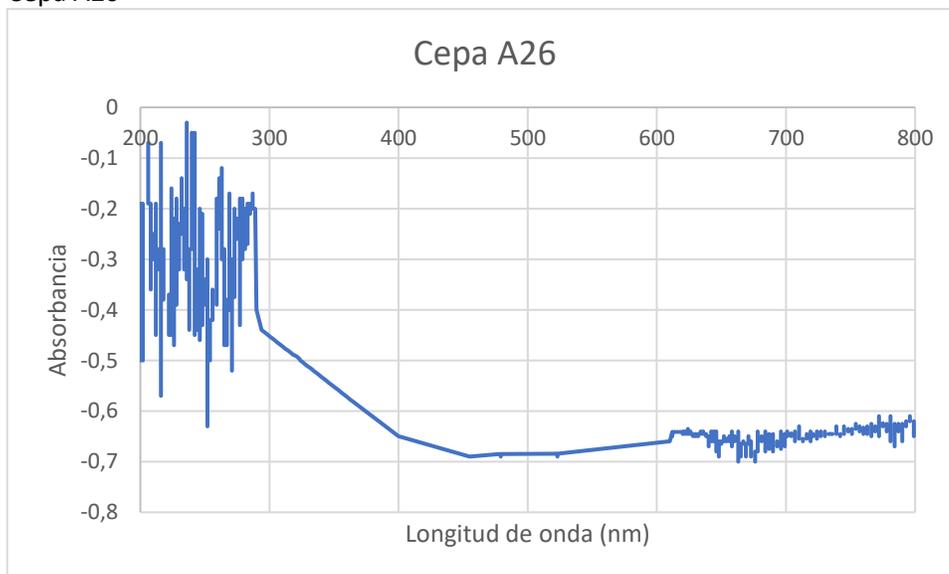
Cepa A24



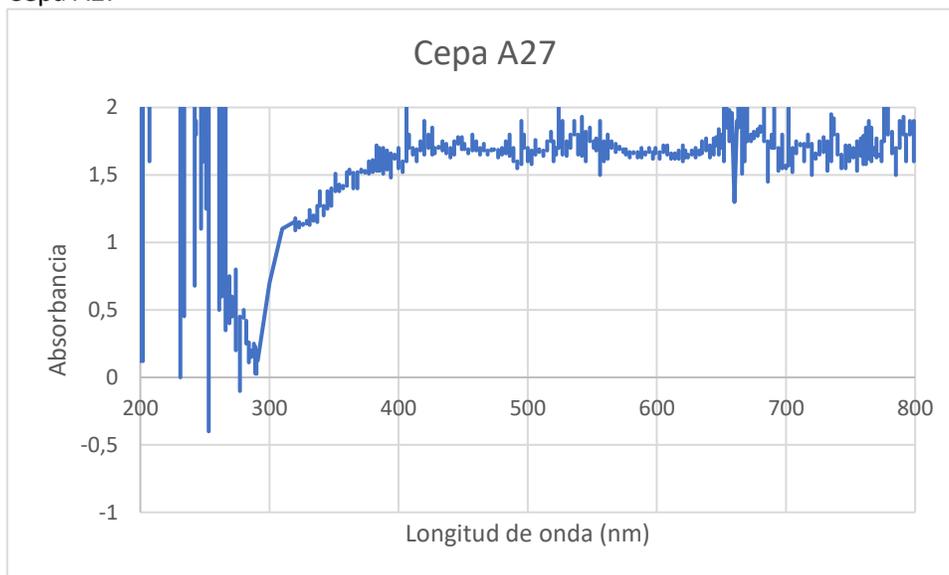
Cepa A25



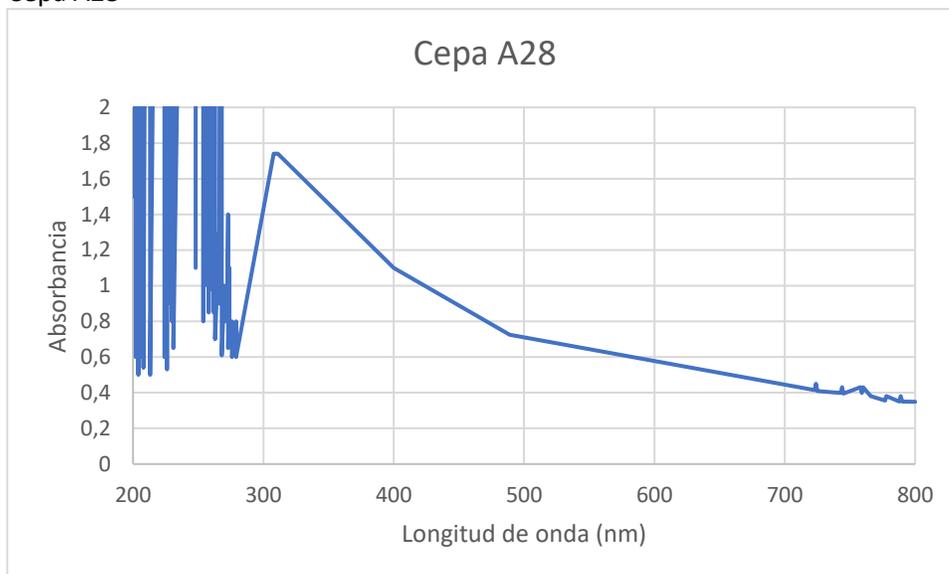
Cepa A26



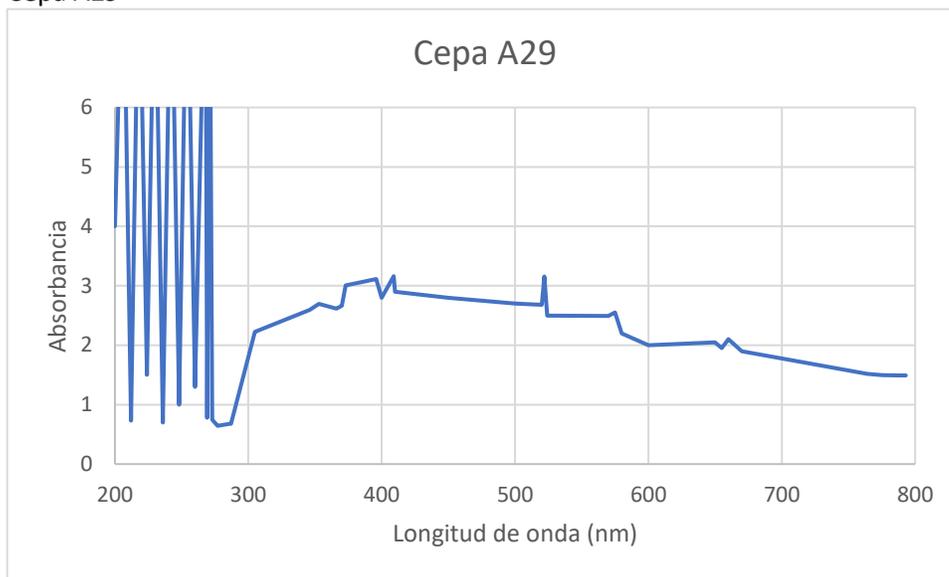
Cepa A27



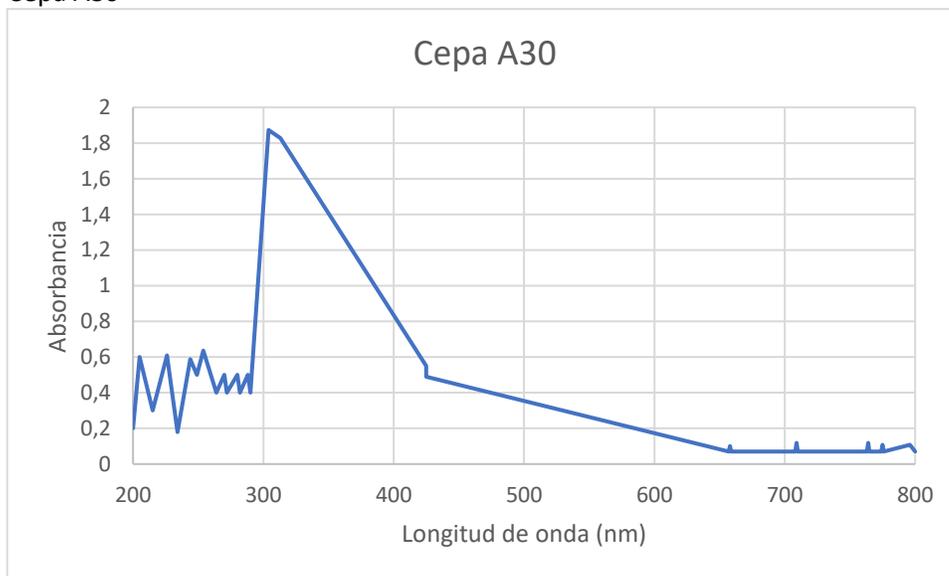
Cepa A28



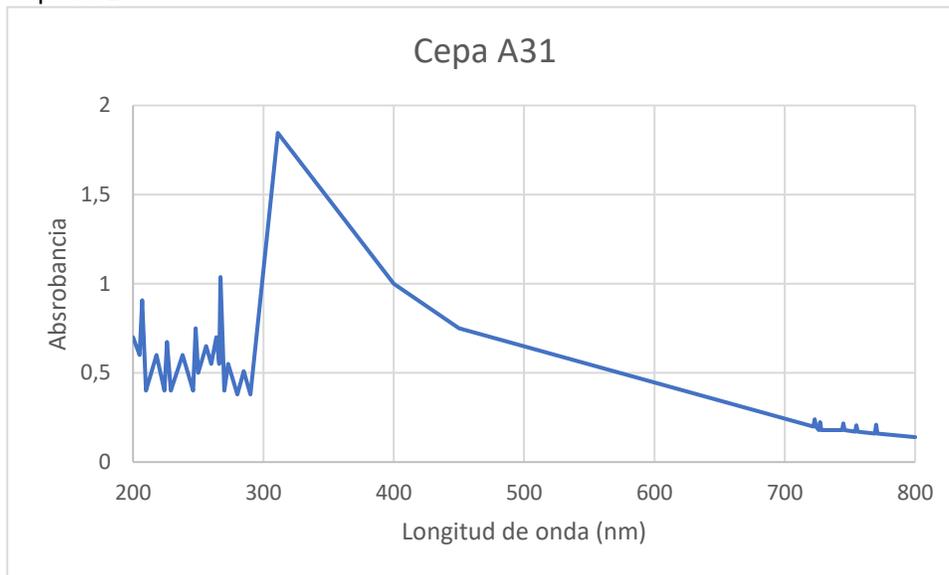
Cepa A29



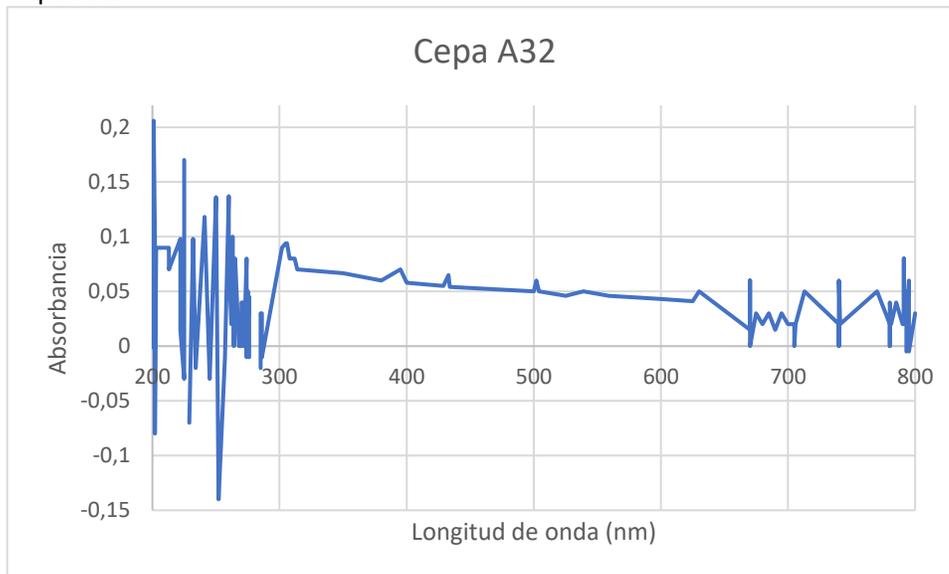
Cepa A30



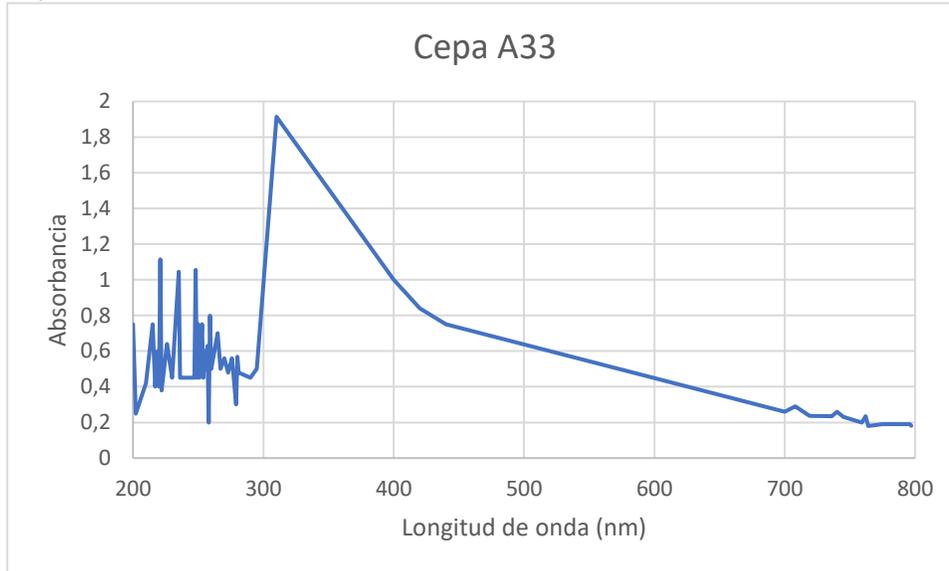
Cepa A31



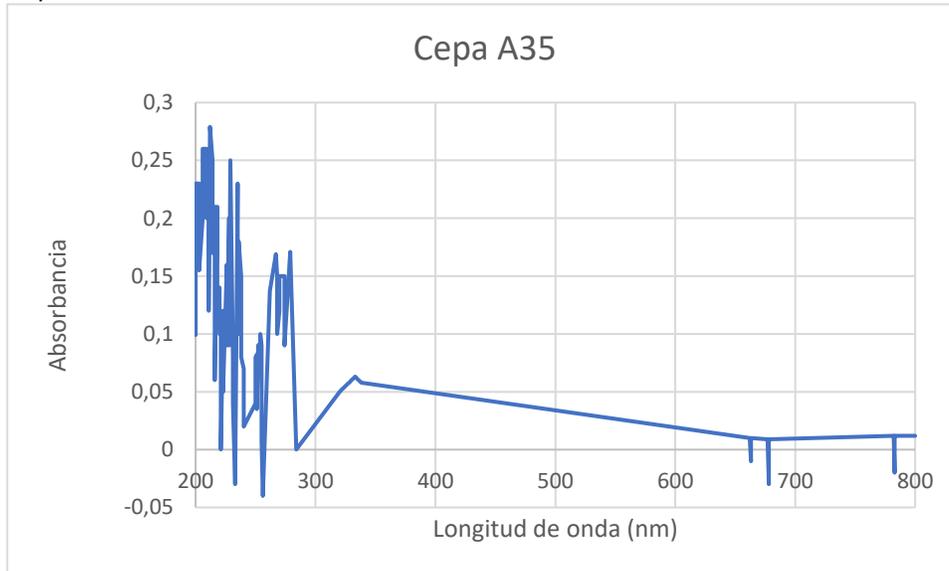
Cepa A32



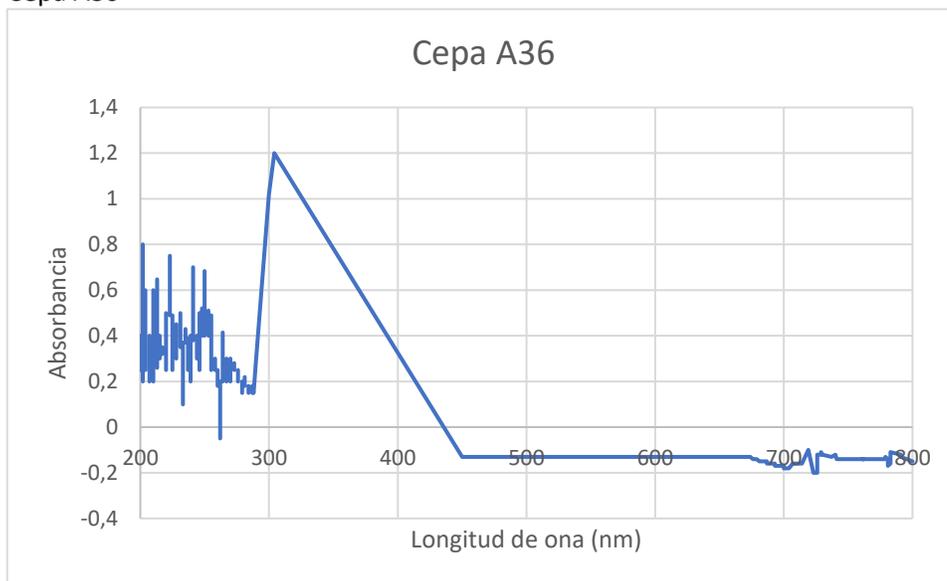
Cepa A33



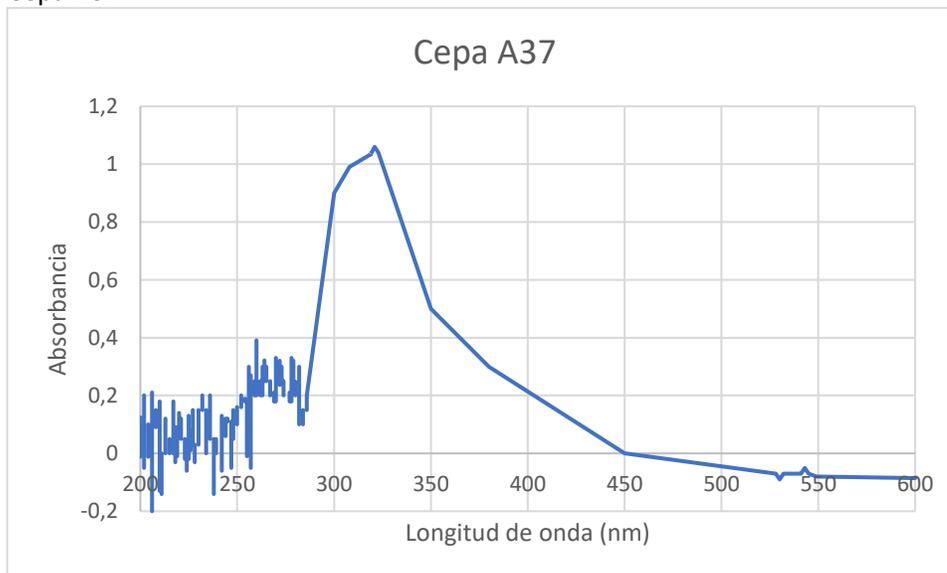
Cepa A35



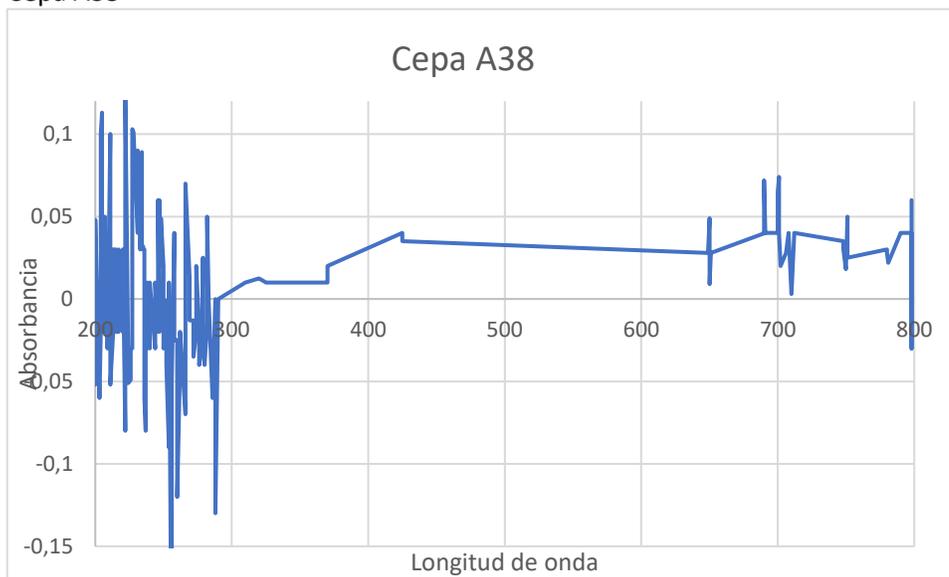
Cepa A36



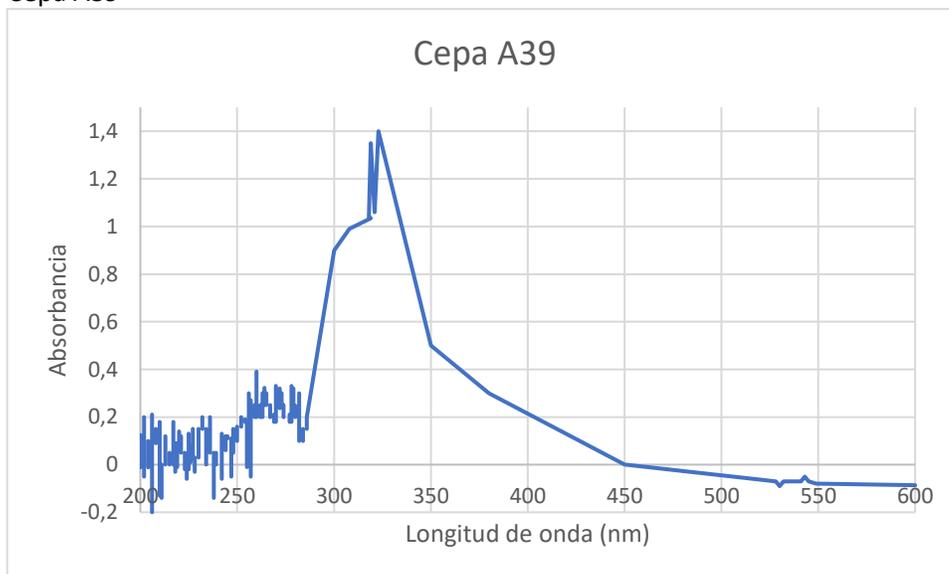
Cepa A37



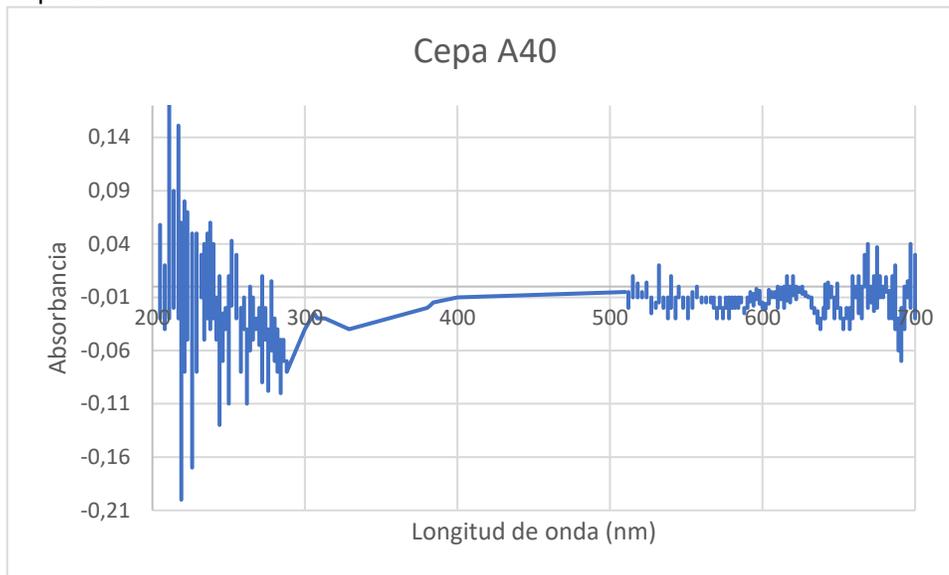
Cepa A38



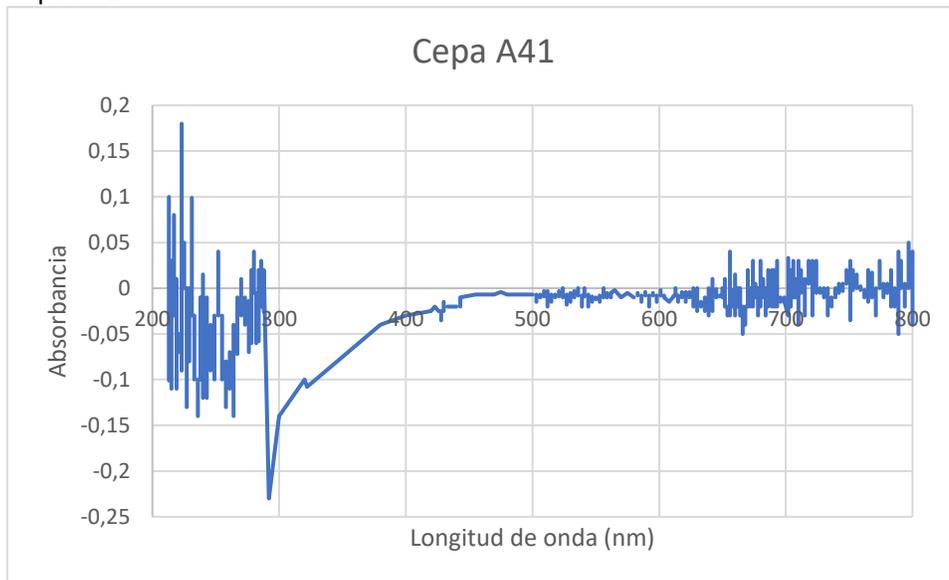
Cepa A39



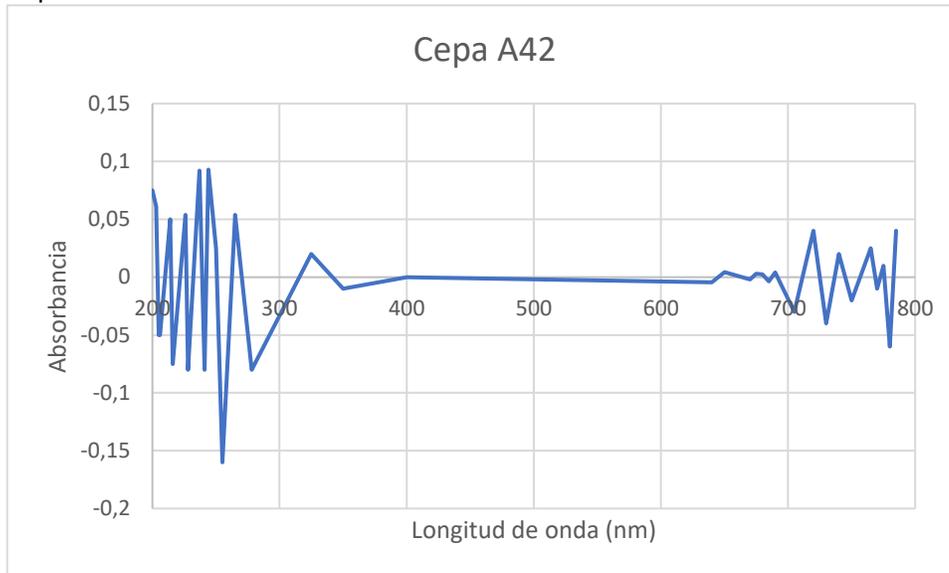
Cepa A40



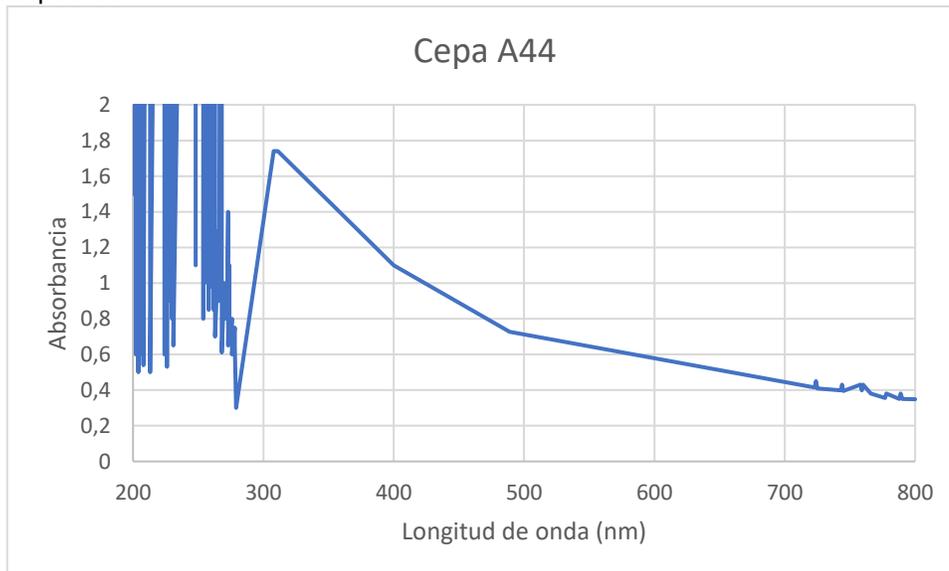
Cepa A41



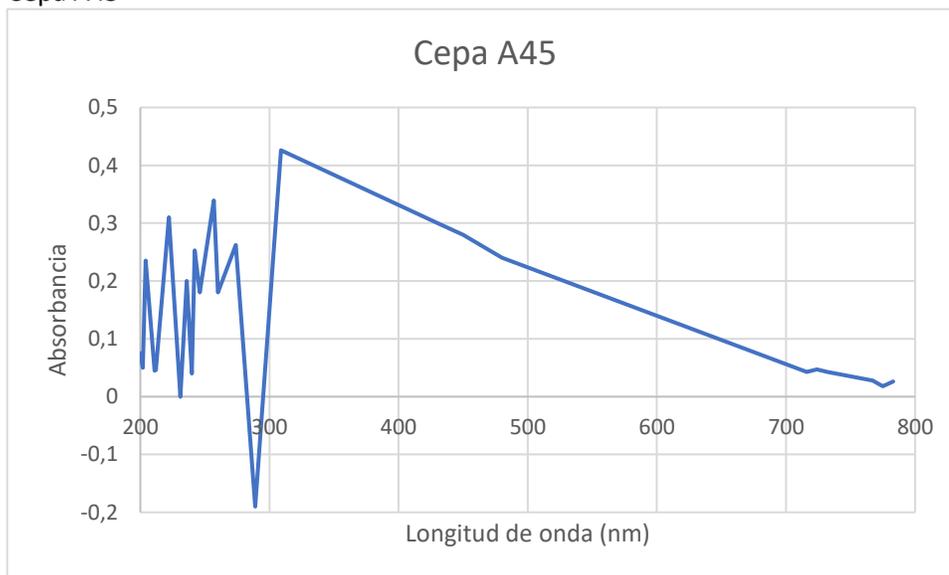
Cepa A42



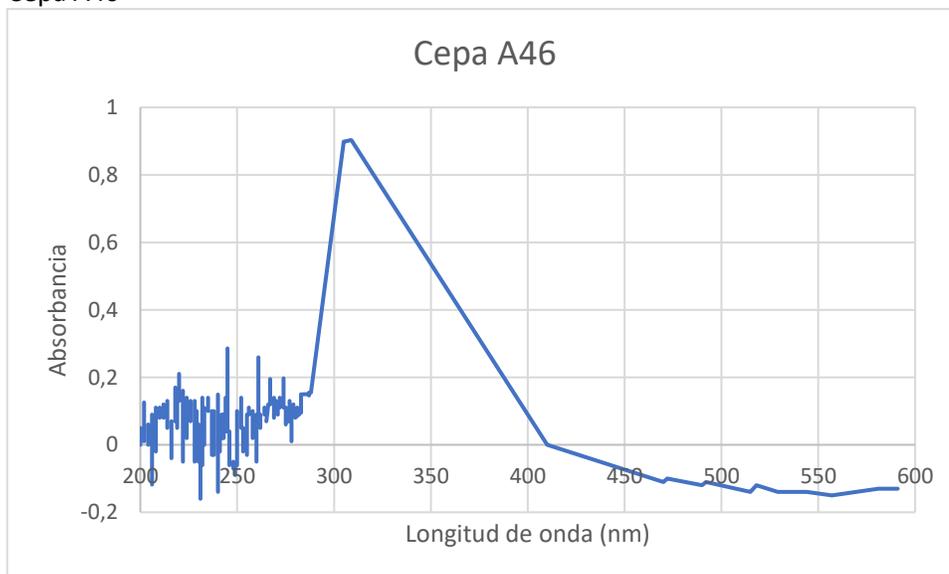
Cepa A44



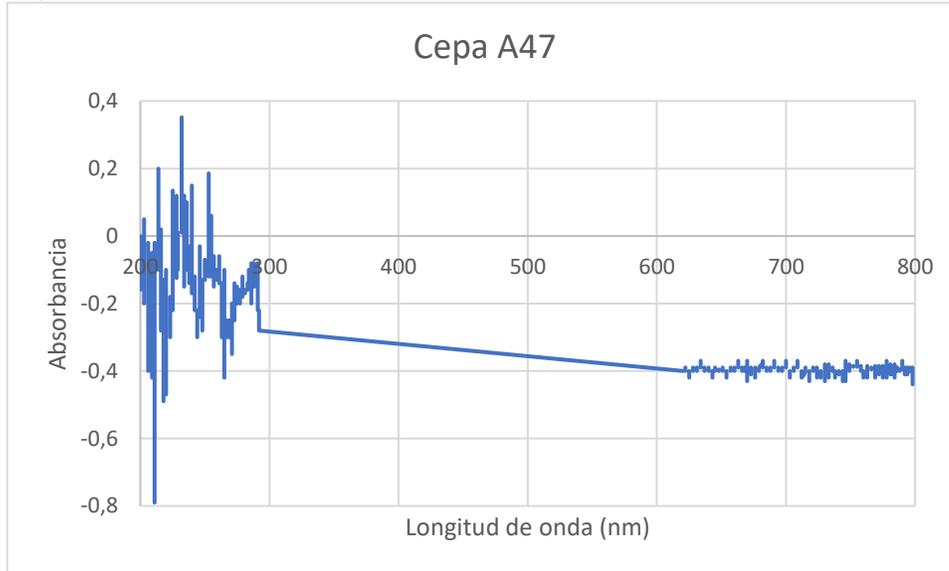
Cepa A45



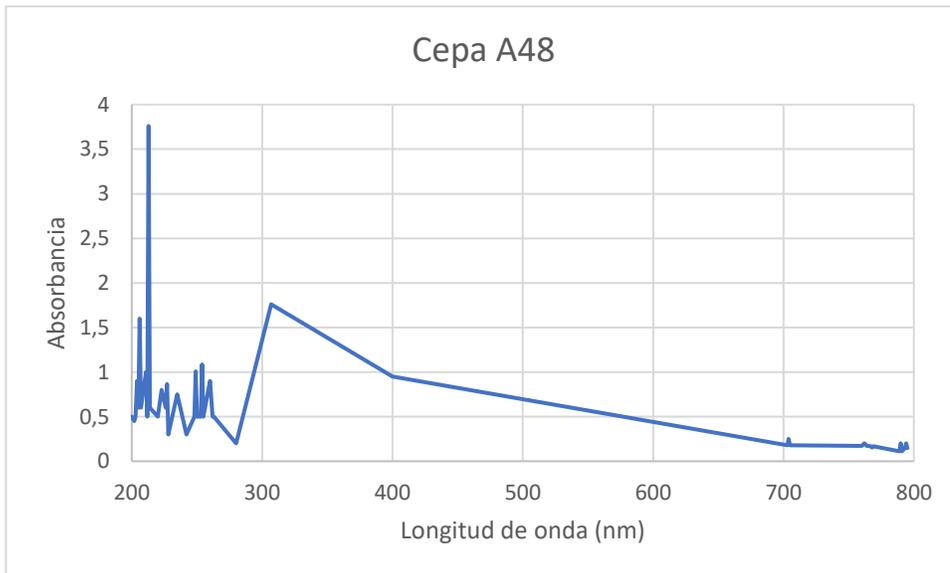
Cepa A46



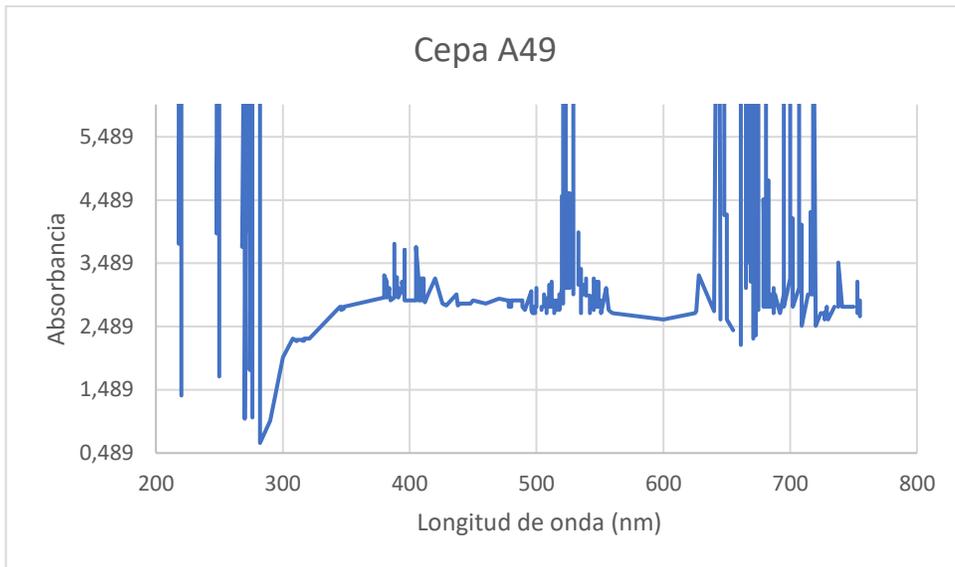
Cepa A47



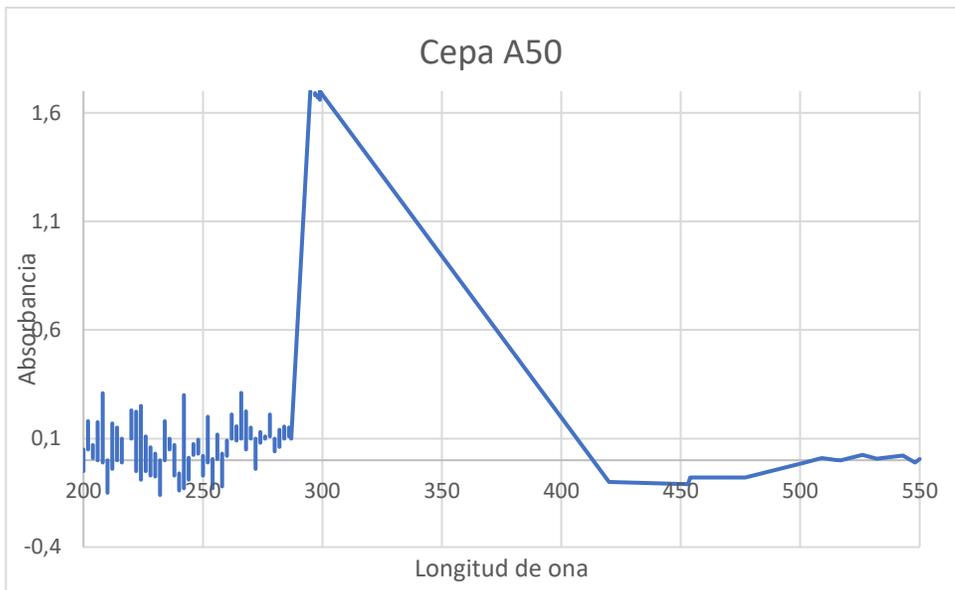
Cepa A48



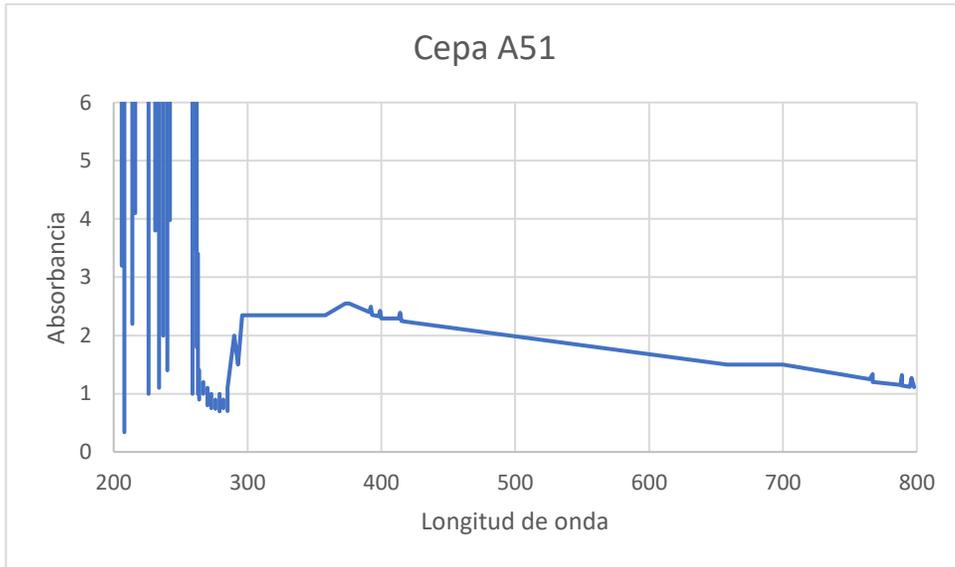
Cepa A49



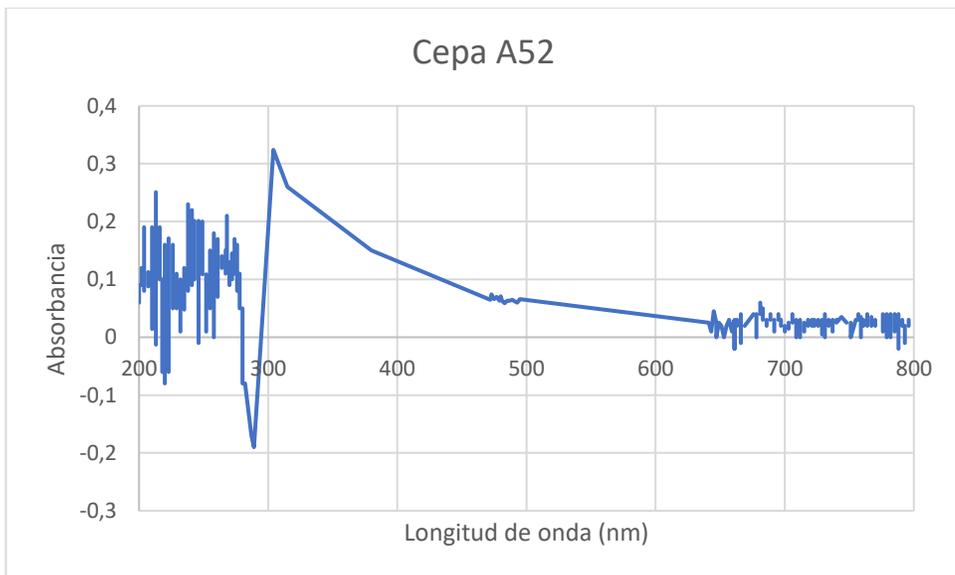
Cepa A50



Cepa A51



Cepa A52



Cepa A53

