

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA**

**Caracterización morfológica de aislados bacterianos
provenientes de una piscina de petróleo
de la Amazonía ecuatoriana**

Disertación previa a la obtención del título de Microbiólogo

JONATTAN DANIEL TOBAR CIFUENTES

Quito, 2023

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres, William Tobar y Verónica Cifuentes, quienes han sido mi mayor inspiración y sostén incondicional a lo largo de mi trayectoria académica. Su apoyo y sacrificio han sido fundamentales para que hoy pueda alcanzar este logro. Gracias por su constante aliento y por creer en mí en cada paso del camino.

A mi hermana, Melanie Carolina Tobar Cifuentes, quien me apoyo incondicionalmente en todo momento. Este logro también es tuyo, y estoy agradecido de tenerte como hermana.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por brindarme todos los conocimientos que fueron necesario para culminar este proyecto con los mejores resultados.

A mi asesora, Eliza Jara que, gracias a su sabiduría, guía experta y dedicación en la supervisión de este trabajo. Sus conocimientos, consejos y apoyo han sido fundamentales para poder desarrollo de la mejor manera y con una excelente calidad esta investigación. Siempre estaré agradecido por darnos la oportunidad de ser parte del proyecto y por todos los consejos que nos dio.

A mis amigos, quienes han estado a mi lado durante todo el camino. Gracias por cada momento que pasamos juntos, tanto buenos como malos los cuales nos han llevado hasta este punto. Gracias por ser quienes en momentos difíciles me acompañaban y me daban su soporte para seguir adelante. Su compañía ha hecho este viaje mucho más significativo.

LISTA DE ABREVIATURAS

rRNA	ARN ribosomal.
TPH	Hidrocarburos totales de petróleo.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
°C	Grados centígrados.
g	Gramos.
h	Horas.
µg	Microgramo (1/1000 000 gramos).
µl	Microlitros (1/1000 000 litros).
µm	Micrómetro (1/1000 000 metros).
ml	Mililitros (1/1000 litros).
min	Minutos.
rpm	Revolución por minuto.
MC	Medio Complejo.
SFM	Medio harina de soya y manitol.
ISP	<i>International Streptomyces Project</i> (Proyecto Internacional Streptomyces)

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
TABLA DE CONTENIDOS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE ANEXOS	ix
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVO GENERAL.....	6
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
5.1 DESCRIPCIÓN DE COLONIAS Y PRODUCCIÓN DE PIGMENTO MELANOIDE.....	12
5.2 TOLERANCIA AL pH	19
5.3 UTILIZACIÓN DE CARBOHIDRATOS	21
5.4 IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS	22
6. CONCLUSIONES	28
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
8. ANEXOS.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Crecimiento de la cepa EC 5 en medio agar 5265 (ISP2), agar 5315 (ISP3), agar 5317 (ISP4), agar 5323 (ISP5) y agar 5322 (ISP7), Medio Complejo (MC), Medio harina de soya-manitol (SFM) y microscopia a 40x, a partir del medio agar 5265 (ISP2). Productora del pigmento soluble.....	12
Figura 2. Crecimiento de la cepa EC 9 en medio agar 5265 (ISP2), agar 5315 (ISP3), agar 5317 (ISP4), agar 5323 (ISP5) y agar 5322 (ISP7), Medio Complejo (MC), Medio harina de soya-manitol (SFM) y microscopia a 40x, a partir del medio agar 5265 (ISP2). No productora del pigmento soluble.....	13
Figura 3. Crecimiento de la cepa EC 13 en medio agar 5265 (ISP2), agar 5315 (ISP3), agar 5317 (ISP4), agar 5323 (ISP5) y agar 5322 (ISP7), Medio Complejo (MC), Medio harina de soya-manitol (SFM) y microscopia a 40x, a partir del medio agar 5265 (ISP2). Productora del pigmento soluble.....	13
Figura 4. Crecimiento de la cepa EC 15 en medio agar 5265 (ISP2), agar 5315 (ISP3), agar 5317 (ISP4), agar 5323 (ISP5) y agar 5322 (ISP7), Medio Complejo (MC), Medio harina de soya-manitol (SFM) y microscopia a 40x, a partir del medio agar 5265 (ISP2). Productora del pigmento soluble.....	14
Figura 5. Crecimiento de la cepa EC 17 en medio agar 5265 (ISP2), agar 5315 (ISP3), agar 5317 (ISP4), agar 5323 (ISP5) y agar 5322 (ISP7), Medio Complejo (MC), Medio harina de soya-manitol (SFM) y microscopia a 40x, a partir del medio agar 5265 (ISP2). No productora del pigmento soluble.....	14
Figura 6. Crecimiento de la cepa EC 18 en medio agar 5265 (ISP2), agar 5315 (ISP3), agar 5317 (ISP4), agar 5323 (ISP5) y agar 5322 (ISP7), Medio Complejo (MC), Medio harina de soya-manitol (SFM) y microscopia a 40x, a partir del medio agar 5265 (ISP2). Productora del pigmento soluble.....	15
Figura 7. Crecimiento de la cepa EC 19 en medio agar 5265 (ISP2), agar 5315 (ISP3), agar 5317 (ISP4), agar 5323 (ISP5) y agar 5322 (ISP7), Medio Complejo (MC), Medio harina de soya-manitol (SFM) y microscopia a 40x, a partir del medio agar 5265 (ISP2). Productora del pigmento soluble.....	15
Figura 8. Crecimiento de la cepa EC 9 en medio agar 5338 (Basal) sin carbohidratos (control negativo).....	22

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Resumen de la coloración del micelio y las colonias de cada cepa en distintos medios sembrados.....	18
Tabla 2.	Resumen del crecimiento de cada cepa en distintos medios sembrados.....	19
Tabla 3.	Resumen del crecimiento de las cepas en el medio líquido 5265 (ISP2) con distintos niveles de pH.....	19
Tabla 4.	Resumen de resultados de la utilización de diferentes carbohidratos como única fuente de carbono para el crecimiento de las cepas estudiadas. En el medio agar basal 5338.....	21
Tabla 5.	Resumen de resultados de las características de cada cepa estudiada y su identificación.....	24
Tabla 6.	Identificación de cepas según los resultados de la investigación.....	26

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 10.1	Composición y preparación de medios de cultivo.....	37
ANEXO 10.2	Composición y preparación de soluciones.....	39
ANEXO 10.3	Composición y preparación de antibiótico y antifúngico.....	40
ANEXO 10.4	Crecimiento de cepas en medio líquido 5265 (ISP 2) con diferentes niveles de pH.....	41
ANEXO 10.5	Características importantes de los principales géneros de actinobacterias considerados para la identificación taxonómica de las cepas.....	43

1. RESUMEN

Dentro de la diversidad microbiana existen varios microorganismos que tienen la capacidad de sobrevivir en ambientes con condiciones extremas de contaminación, como lo son las piscinas de petróleo. Estas piscinas tienen altas concentraciones de hidrocarburos, los cuales pueden afectar a la homeostasis de los microorganismos. Se tomaron muestras de la capa orgánica que recubre una de estas piscinas ubicada en la Amazonía ecuatoriana, para aislar bacterias e interpretar sus características morfológicas y fisiológicas a fin de identificar si pertenecen al filo Actinomycetota. Los aislados previamente purificados fueron cultivados en diferentes medios sólidos y líquidos, a niveles de pH entre 1,8 a 12, con una única fuente de carbono proveniente de diversos carbohidratos, a fin de obtener información de sus características físicas y metabólicas. Como resultado, se observó que la mayoría de las cepas prestaron características morfológicas tanto macroscópicas como microscópicas similares que coinciden con aquellas del filo Actinomycetota. Las cepas EC 17 y EC19 fueron las únicas que no presentaron esporulación. Se encontró que cinco cepas fueron capaces de producir pigmento melanoide. Por otra parte, todas cepas tienen la capacidad de crecer en niveles de pH desde 4 hasta 10, y la mayoría llegaron a utilizar al menos un carbohidrato estudiado, siendo así que la cepa EC13 tiene la capacidad para utilizar todos los carbohidratos estudiados. Teniendo en cuenta estas características, se las comparó con la literatura referente a actinobacterias de suelos contaminados con hidrocarburos y con las descripciones del Manual de Bergey, con lo que se logró identificar cepas pertenecientes a los géneros *Streptomyces*, *Actinomyces*, *Rhodococcus* y *Actinomadura*.

Palabras clave: Actinobacterias, hidrocarburos, morfología, identificación.

2. ABSTRACT

Within the microbial diversity there are several microorganisms that can survive in environments with extreme conditions of contamination, such as oil ponds. These ponds have high concentrations of hydrocarbons, which can affect the homeostasis of microorganisms. Samples of the organic layer that covers one of these ponds located in the Ecuadorian Amazon were taken to isolate bacteria and interpret their morphological and physiological characteristics to identify if they belong to the Actinomycetota phylum. The previously purified isolates were cultivated in different solid and liquid media, at pH levels between 1.8 and 12, with a single carbon source from various carbohydrates, to obtain information on their physical and metabolic characteristics. As a result, it was observed that most of the strains had similar macroscopic and microscopic morphological characteristics that coincide with those of the Actinomycetota phylum. The EC 17 and EC19 strains were the only ones that did not present sporulation. Five strains were found to be capable of producing melanoid pigment. On the other hand, all strains can withstand pH levels from 4 to 10. Most of the strains used at least one studied carbohydrate, while the EC13 strain had the ability to use all of them. These characteristics were compared with the literature referring to actinobacteria from soils contaminated with hydrocarbons and with the descriptions of the Bergey Manual, making it possible to tentatively identify strains belonging to the genera *Streptomyces*, *Actinomyces*, *Rhodococcus* and *Actinomadura*.

Key words: Actinobacteria, hydrocarbons, morphology, identification.

3. INTRODUCCIÓN

Dentro de la diversidad microbiana existen varios microorganismos que tienen la capacidad de sobrevivir en ambientes con condiciones extremas como puede ser lugares con temperaturas por encima de los 100 °C, con temperaturas por debajo de 0 °C, en lugares muy alcalinos o muy ácidos, con una alta concentración salina, elevada presión, entre otros [Velásquez et al., 2018]. Las piscinas de petróleo son un ámbito con condiciones extremas para los microorganismos debido a su alta concentración de contaminantes que pueden provocar un desequilibrio ecológico (Bravo, 2007). En Ecuador, existe el caso Texaco el cual dejó al menos 1000 piscinas de desechos de hidrocarburos, que constituyen un gran problema no sólo para los habitantes de sus alrededores, sino también para la flora y fauna del sector, como menciona Alvarado (2022), quien habla sobre los problemas de contaminación que causan pérdidas en los cultivos y en la fauna.

Son varios los filos microbianos que pueden sobrevivir en ambientes contaminados con hidrocarburos. Castillo et al. (2020) al investigar bacterias con potencial biorremediador y las comunidades bacterianas de una zona impactada por derrame de petróleo en Perú, reportó que los filos *Proteobacteria* y *Bacteroidetes* fueron las que predominaron en las muestras contaminadas con hidrocarburos. Por otro lado, Gavilánez (2013) caracterizó bacterias mesófilas y neutrófilas en ambientes contaminados con derivados de petróleo (TPHs) en donde también se han encontrado cepas de actinobacterias.

Las actinobacterias o actinomicetos son bacterias Gram positivas que se encuentran en varios hábitats donde su principal función es participar en la descomposición de materia orgánica (Quiñonez, 2021). Por otro lado, estas presentan un desarrollo unicelular, aunque ciertas especies tienen un crecimiento micelial filamentoso que se caracteriza por la formación de hifas enramadas, que ayuda a diferenciarlas entre géneros, junto con los tipos de esporas que poseen (Martínez et al., 2017).

En el estudio realizado por Chamorro (2018), se llevaron a cabo diferentes ensayos para caracterizar actinomicetos aislados de suelos contaminados con diferentes hidrocarburos. Estos ensayos permitieron observar tanto características macroscópicas como microscópicas de cada una de las cepas, además de pruebas de crecimiento en distintas condiciones de temperatura, niveles de pH y salinidad.

Por otra parte, en el estudio de González (2005), se centraron en la caracterización de los microorganismos rizosféricos, como las actinobacterias, mediante el uso de medios sólidos y pruebas bioquímicas. En el estudio de Uzcátegui-Negrón (2009), se caracterizaron las actinobacterias a través de pruebas fisiológicas, como la degradación de urea, caseína, tirosina o xantina, y también se realizaron pruebas bioquímicas. Además, se logró su identificación mediante técnicas de bioquímica molecular, utilizando oligonucleótidos para amplificar y codificar el 16s rRNA bacteriano (García, 2021). En el caso de las actinobacterias, su morfología es una característica fundamental para su identificación, ya que son organismos que presentan una amplia variabilidad morfológica, que va desde formas cilíndricas y cocoidales hasta unicelulares, contribuyendo a la formación de un micelio aéreo o vegetativo (Guerra, 2014). También es importante considerar sus características macroscópicas, como la textura polvosa, el color, la forma, el borde y la superficie de la colonia (Guevara, 2017).

En cuanto a la caracterización de actinobacterias, se debe realizar una aproximación polifásica que incluya varios métodos, como el morfológico, fisiológico, molecular y/o quimio taxonómico. Siempre se deben seguir tres pasos concretos: la obtención de cultivos puros del microorganismo, la determinación de sus indicadores relevantes y la comparación de esa información con publicaciones confiables y bases de datos (Dhanasekaran y Jiang, 2016). En el estudio realizado por Guevara (2017), se aislaron y caracterizaron cepas de actinobacterias mediante la purificación de colonias con rasgos específicos. Posteriormente, se realizaron pruebas bioquímicas y se identificó el posible género utilizando fotografías tomadas en la tinción Gram de cada cepa. Sin embargo, la caracterización morfológica y fisiológica tiene ciertas limitaciones debido a que existen varias características similares entre géneros. Por ello, varios autores

emplean un método molecular en el cual se amplifica, mediante PCR, la sección conservada que codifica el 16s rRNA bacteriano.

La caracterización de microorganismos permite identificar de forma inequívoca una especie o cepa. Desde un punto de vista microbiológico, una especie es un grupo taxonómico específico de una colección de cepas bacterianas que posee una o varias características fisiológicas en común (Murray, 2018). En los últimos años, según Sáez et al. (2018), en los últimos años se han descubierto alrededor de 130 especies nuevas de actinobacterias marinas mediante técnicas moleculares. Por otro lado, en el estudio realizado por Parada, Margeuet y Vallejo (2017), se logró caracterizar 37 especies de actinobacterias provenientes de suelos. Teniendo en cuenta lo anterior, el descubrimiento de nuevas especies de microorganismos reviste gran importancia en varios ámbitos. Puede contribuir al conocimiento de la biodiversidad microbiana del planeta y profundizar nuestra comprensión de las formas de vida microscópicas. Asimismo, puede ampliar el conocimiento científico y tener aplicaciones en la biotecnología, permitiéndonos comprender mejor las características y el potencial de estos microorganismos. Además, su estudio puede proporcionar información relevante para abordar cuestiones relacionadas con la salud humana.

En esta investigación, se ha buscado evidenciar la presencia de especies pertenecientes al filo *Actinomycetota* en la capa de materia orgánica que recubre una piscina de petróleo en la Amazonia ecuatoriana. Con este fin, se han analizado tanto las características morfológicas como fisiológicas de los microorganismos aislados de dicha piscina de petróleo, con el objetivo de responder a las siguientes preguntas: ¿Cuáles son los géneros que han logrado adaptarse a las condiciones extremas presentes en una de las piscinas de petróleo del campo Charapas? y ¿Presentan estos microorganismos similitudes con actinobacterias provenientes de ambientes contaminados por hidrocarburos?

OBJETIVO GENERAL

Identificar aislados pertenecientes al filo Actinomycetota en una piscina de petróleo de la Amazonía ecuatoriana mediante características morfológicas y fisiológicas

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar aislados bacterianos provenientes de una piscina de petróleo mediante su morfología, el uso de carbohidratos específicos, la tolerancia a distintos niveles de pH y la producción de melanina.
2. Establecer la similitud de los aislados caracterizados con la bibliografía referente a géneros de actinobacterias provenientes de ambientes contaminados por hidrocarburos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE BACTERIAS

Este estudio se realizó a partir de siete cepas que fueron tomadas en la región del oriente del Ecuador, aisladas de la rizosfera del suelo de una piscina de petróleo que está ubicado en el campo Charapa, cantón Lago Agrío, provincia de Sucumbíos, sitio descrito por Gordillo y Decock (2019).

Para su aislamiento se empleó el protocolo de Adam et al. (2018) modificado; donde se suspendió 0,5 g de suelo en 50 mL de tapón fosfato 0.01 (pH 7,0), se agitó con vortex durante 5 min para incubarla por 90 min a 30 °C. Luego, se transfirió 8 mL del sobrenadante a un tubo de centrifuga cónico de 15 mL para centrifugarlo a temperatura ambiente durante 10 min a 3000 rpm. Después de una incubación de 30 min a 30°C, se inoculó 100 µL de diluciones seriadas (hasta 10⁻²) en medio sólido agar las cajas Petri se incubaron a 27 °C durante 4 semanas, y se seleccionaron colonias promisorias para subcultivarlas hasta obtener cepas puras que se almacenaron en medios sólidos a 4 °C.

4.2 OBTENCIÓN DE STOCK DE MICELIO PARA PRUEBAS FISIOLÓGICAS

Para obtener el stock de micelio se preparó caldo ISP2 y matraces Erlenmeyer de 125 mL con esferas de vidrio y se autoclavó. Luego, en la cabina de flujo laminar (BioBase HCM-400), se colocó 50 mL del medio líquido en cada matraz para luego inocular colonias de presuntos actinomicetos aisladas anteriormente. Para ello, se tomó la colonia del medio sólido con ayuda de un palillo estéril y se la depositó en el caldo. Los matraces inoculados se los colocó en un agitador (Optic Ivymen System) con temperatura de 28 °C a 140 rpm durante 72h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, bajo flujo laminar se transfirió el medio con el micelio a un tubo cónico de polipropileno estéril (tipo Falcón) de 50 mL para centrifugarlo (Scientific MR23i) a 3500 g durante 10 min a 4 °C. Igualmente, bajo flujo laminar, se descartó el sobrenadante evitando desechar el pellet formado. El pellet fue lavado dos veces con 10 mL de agua estéril; en cada ocasión, cada tubo

fue agitado con vortex (Fisher Scientific G-560) durante 10 s antes de colocarlo en la centrífuga (10 min, 3500 g, 4°C). Al finalizar, se colocaron 2 mL de agua estéril y 2 mL de glicerol 40% para obtener la suspensión de micelio, que fue trasvasada a criotubos de 2 mL para su preservación. Se obtuvieron dos tubos por cada aislado, uno para usarlo como stock de trabajo (almacenamiento a -20°C) y otro para mantenerlo como respaldo a -80°C.

4.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y FISIOLÓGICA

Los procedimientos utilizados para identificar las características del microorganismo se basaron en una serie de protocolos seleccionados del Instituto Leibniz DSMZ - Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares, tal como se describen en detalle por Wink (2012).

4.3.1 DESCRIPCIÓN DE COLONIAS Y PRODUCCIÓN DE PIGMENTO MELANOIDE

Para este procedimiento se utilizaron los siguientes medios, incluyendo Medio Complejo (MC), agar 5265 (ISP2), agar 5315 (ISP3), agar 5317 (ISP4), agar 5323 (ISP5) y agar 5322 (ISP7). En donde el medio ISP 7 ayudó a revelar la producción del pigmento melanoide de cada cepa. Cada una de las cepas, previamente identificadas como EC#, fue inoculada en cada medio sólido mencionado anteriormente. Se dividió cada caja Petri en 3 secciones para sembrar 3 cepas diferentes, utilizando 20 µL del stock de micelio. Luego, se realizó el estriado y se selló cada caja con Parafilm para incubarlas a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 7-10 días.

Pasado este tiempo, se describieron las características tanto macro como microscópicas de cada una de las cepas en donde se tomó en cuenta:

- Crecimiento (G): Se interpretó como “buen crecimiento (++)”, “crecimiento escaso (+)” y “no crecimiento (-)”

- Color reverso (R): Color del micelio del sustrato influenciado en ocasiones por un pigmento soluble, donde se utilizan códigos RAL una vez transformados de la síntesis aditiva en RGB.
- Micelio Aéreo (A): Se diferenció entre “buena formación (+)” y “formación escasa (-)”
- Pigmento Soluble (S): En caso de que exista, el color se describió utilizando el código RAL. Con el programa Microsoft Paint (versión 22H2, Windows 10), se identificaron los colores de cada una de las cepas en formato RGB. Luego, se introdujeron los valores RGB en el conversor HEXtoRAL (2023) para obtener el código RAL correspondiente. Posteriormente, se buscó información sobre cada código en una base de datos (ColoresRAL, 2023).

También, se describieron las colonias en términos de su forma, elevación y margen. Por otro lado, utilizando el microscopio BX53F Olympus en contraste de fases positiva, se observó el desarrollo de estructuras filamentosas conocidas como micelio y la presencia de esporas mediante la técnica de montaje en fresco.

4.3.2 TOLERANCIA AL pH

En este estudio se evaluó la tolerancia de las cepas analizadas a diferentes pH, utilizando el medio líquido 5265 (ISP2), al que se añadió diferentes cantidades de ácido (HCl 2M) o base (NaOH 2M), para obtener pH de 1.8, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12, medidos con un pHmetro (Martini Mi 805) debidamente calibrado. Luego, se colocaron 7 mL de medio en tubos de ensayo y se etiquetaron con el nivel de pH correspondiente, y se autoclavaron. Posteriormente, bajo flujo laminar, se inoculó 20 μ L del stock de micelio (a temperatura ambiente) en cada tubo del respectivo pH, por duplicado. Finalmente, los tubos de ensayo inoculados se incubaron en un agitador Optic Ivymen System a 28 °C y 140 rpm durante 72 horas.

Los resultados de este estudio se evaluaron dependiendo el crecimiento en el medio líquido ISP2 en donde se utilizaron parámetros similares al anterior ensayo: Crecimiento (G): Se interpretó como buen crecimiento (++), crecimiento escaso (+) y no crecimiento (-).

4.3.3 UTILIZACIÓN DE CARBOHIDRATOS

Para diferenciar entre géneros de actinobacterias, se emplearon ocho carbohidratos: glucosa, celulosa, sucrosa, arabinosa, manitol, inositol, ramnosa y rafinosa (Sigma Aldrich, grado analítico). Usando el método de Shirling y Gottlieb (1966), el medio agar basal 5338 se preparó de acuerdo con la composición detallada en el Anexo 1, teniendo en cuenta los carbohidratos que se le añadiría para obtener una concentración final de 1%.

Por otro lado, cada uno de los carbohidratos se los diluyó en 40 mL de agua destilada y se esterilizó la solución pasándola por un filtro de jeringa (Millex-GS) de 0,22 µm. Dentro de la cabina de flujo laminar (BioBase HCM-400), se agregó tanto antifúngico (cicloheximida >98%) como antibiótico (Ácido nalidíxico) y también se colocó el carbohidrato previamente filtrado. Se homogenizó el medio y se vertieron entre 25 a 30 mL en cada caja Petri. Cada caja se dividió en tres secciones, y en cada una se estrió 20 µL de cada cepa. En cuanto al control positivo, se utilizó glucosa como fuente de carbohidrato, mientras que en el control negativo no se empleó ningún carbohidrato. Por último, se sellaron las placas con Parafilm y se incubaron en una incubadora Thermo Scientific Precision a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 10 días.

Pasado los días de incubación, se tomó las cajas de control como referencia para comparar con los demás carbohidratos y evaluar el crecimiento que hubo en cada caso, dependiendo esto se calificó de la siguiente manera:

- Crecimiento no mejor que el control negativo -
- Crecimiento mejor que el control negativo, pero no como el control positivo (+)
- Crecimiento como el control positivo +
- Crecimiento mejor que el control positivo ++

4.4 DETERMINACION DE GÉNERO

Para el estudio, se realizó una revisión bibliográfica para identificar investigaciones previas relacionadas con actinobacterias provenientes de ambientes contaminados con hidrocarburos. Dentro de esta investigación se usaron diversas bases de datos como SciELO, PubMed, Microbiology Society y Scopus. A partir de veinte artículos relevantes, se extrajeron datos como el objetivo del estudio de los géneros y/o cepas reportadas, su metodología, caracterización morfológica, matriz en la que fueron aisladas, producción de melanina, tolerancia al pH y utilización de carbohidratos, para realizar una comparación con los resultados obtenidos en la investigación.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La caracterización fisiológica de los microorganismos desempeña un papel fundamental en la comprensión de su adaptación y función en los ecosistemas; al conocer sus características, se facilita el estudio de su comportamiento y su papel en el entorno. Además, estas características tienen relación con la capacidad nutricional, los productos metabólicos y la respuesta a diferentes condiciones ambientales, los cuales son factores utilizados para identificar y clasificar microorganismos en distintos géneros o especies (Araujo et al., 2020).

5.1 DESCRIPCIÓN DE COLONIAS Y PRODUCCIÓN DE PIGMENTO MELANOIDE

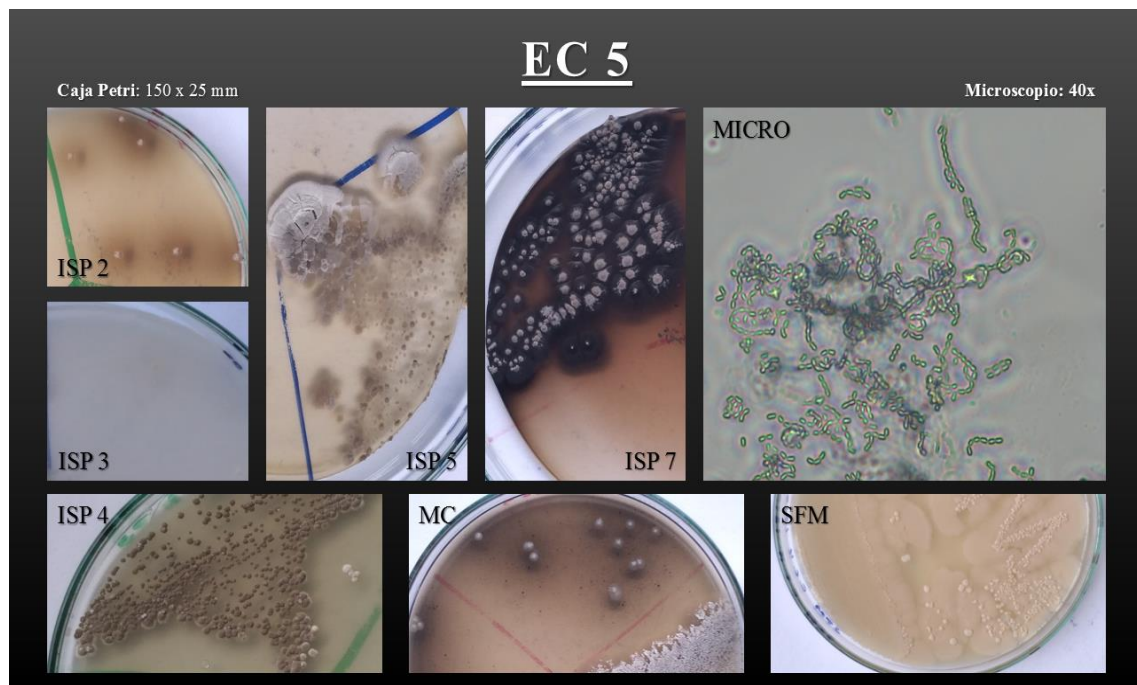


Figura 1. Crecimiento de la cepa EC 5 en medio agar 5265 (ISP2), agar 5315 (ISP3), agar 5317 (ISP4), agar 5323 (ISP5) y agar 5322 (ISP7), Medio Complejo (MC), Medio harina de soya-manitol (SFM) y microscopía a 40x, a partir del medio agar 5265 (ISP2).

Productora del pigmento soluble.

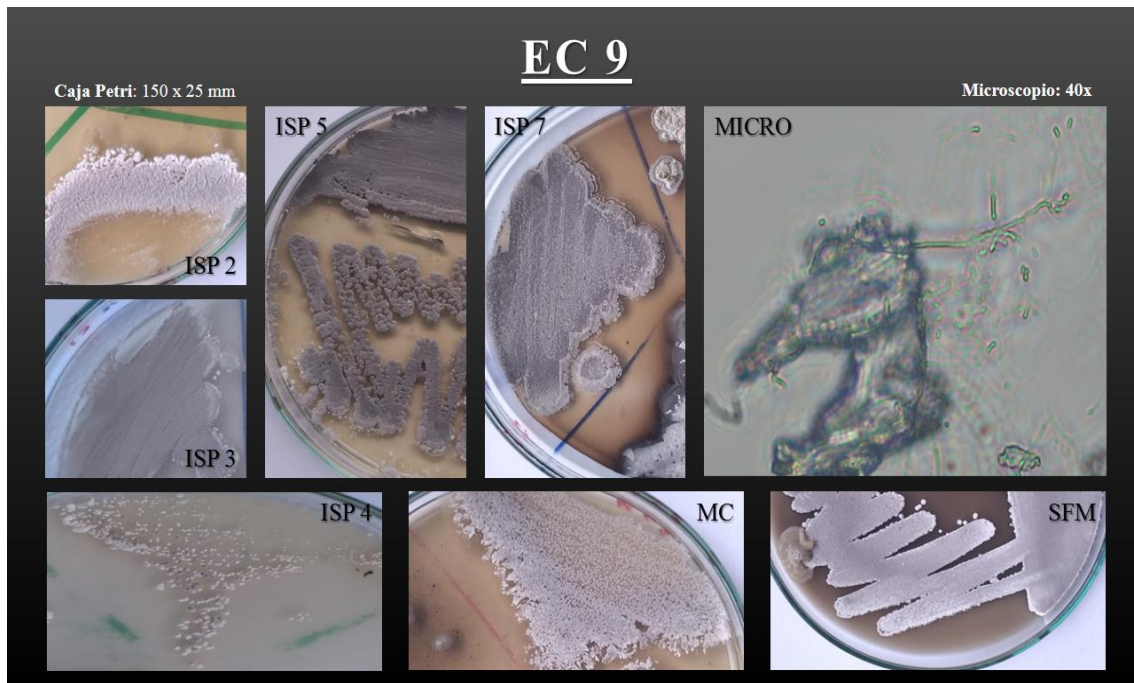


Figura 2. Crecimiento de la cepa EC 9 en medio agar 5265 (ISP2), agar 5315 (ISP3), agar 5317 (ISP4), agar 5323 (ISP5) y agar 5322 (ISP7), Medio Complejo (MC), Medio harina de soya-manitol (SFM) y microscopía a 40x, a partir del medio agar 5265 (ISP2).
No productora del pigmento soluble.

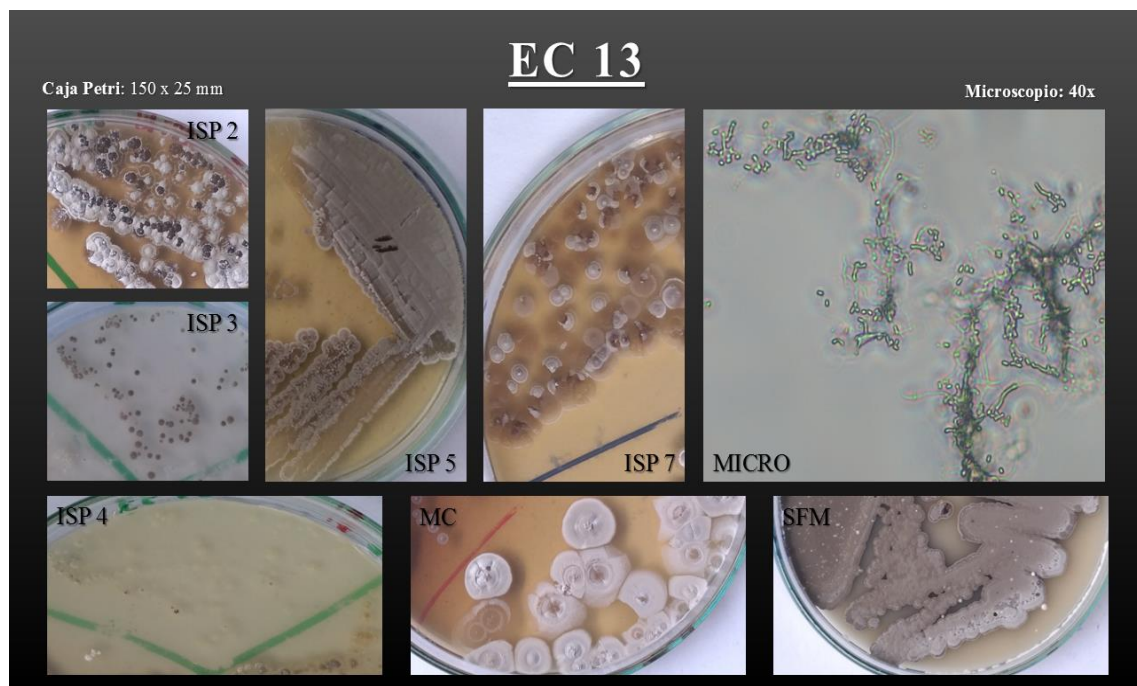


Figura 3. Crecimiento de la cepa EC 13 en medio agar 5265 (ISP2), agar 5315 (ISP3), agar 5317 (ISP4), agar 5323 (ISP5) y agar 5322 (ISP7), Medio Complejo (MC), Medio harina de soya-manitol (SFM) y microscopía a 40x, a partir del medio agar 5265 (ISP2).
Productora del pigmento soluble.

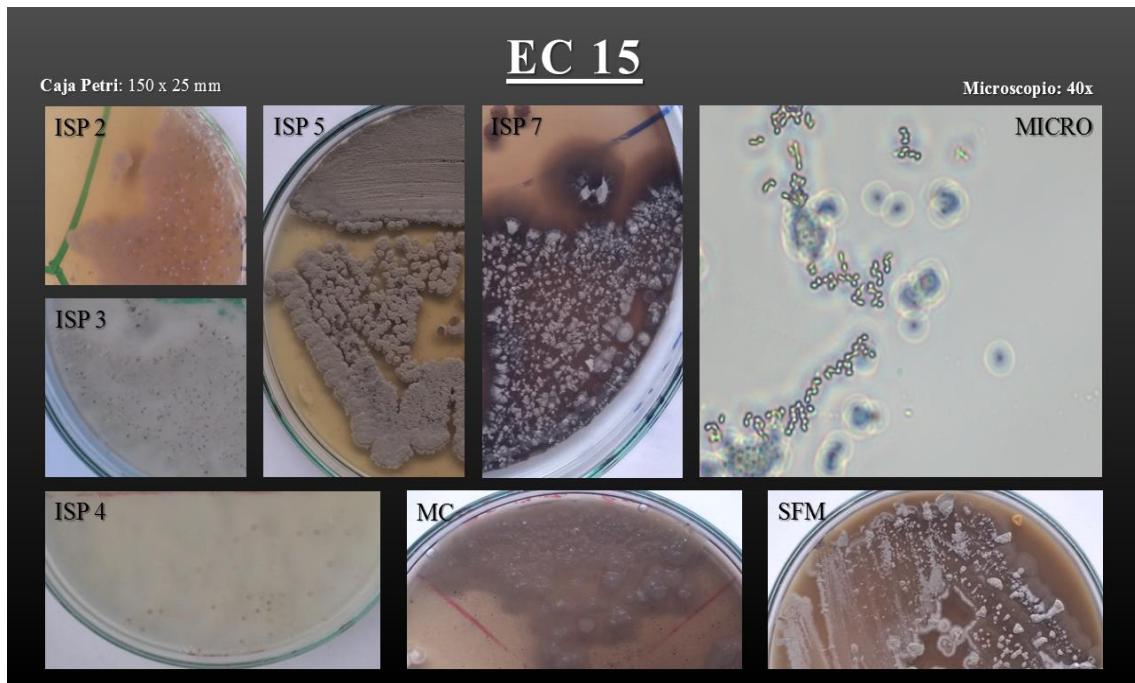


Figura 4. Crecimiento de la cepa EC 15 en medio agar 5265 (ISP2), agar 5315 (ISP3), agar 5317 (ISP4), agar 5323 (ISP5) y agar 5322 (ISP7), Medio Complejo (MC), Medio harina de soya-manitol (SFM) y microscopía a 40x, a partir del medio agar 5265 (ISP2).
Productora del pigmento soluble.

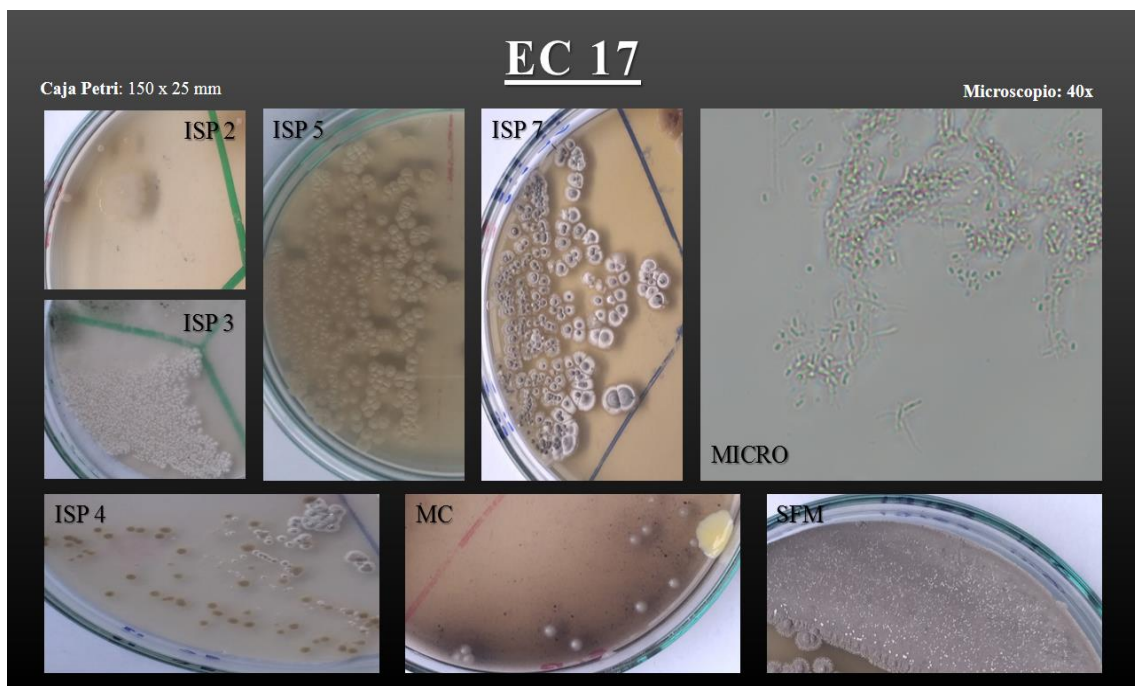


Figura 5. Crecimiento de la cepa EC 17 en medio agar 5265 (ISP2), agar 5315 (ISP3), agar 5317 (ISP4), agar 5323 (ISP5) y agar 5322 (ISP7), Medio Complejo (MC), Medio harina de soya-manitol (SFM) y microscopía a 40x, a partir del medio agar 5265 (ISP2).
No productora del pigmento soluble.

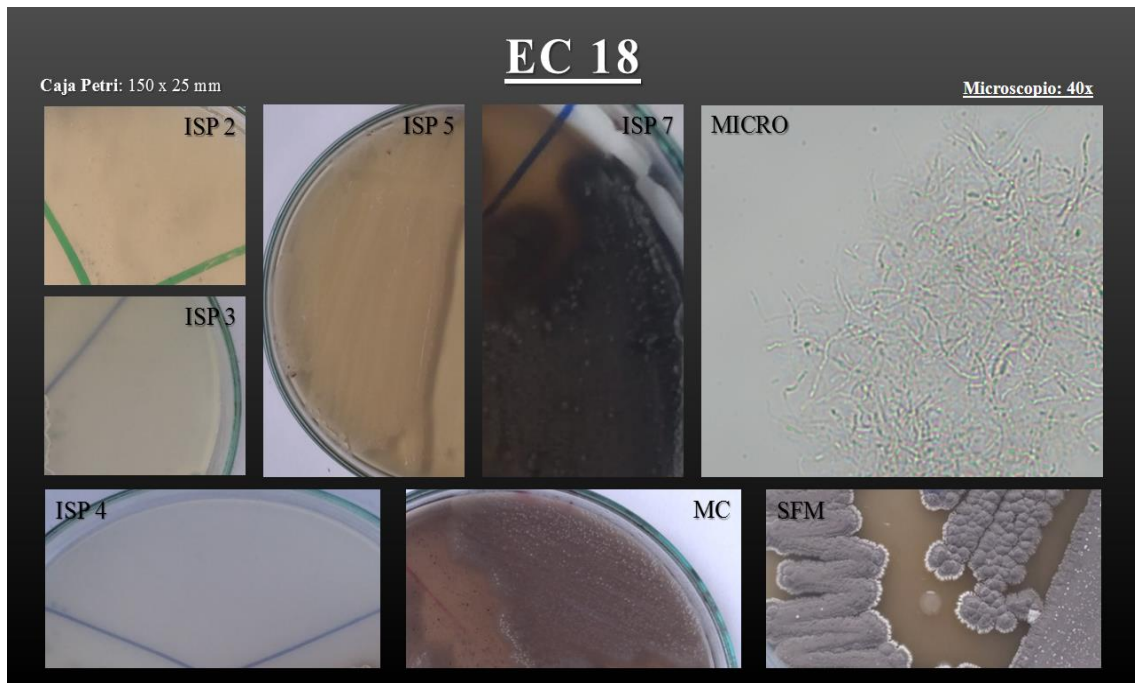


Figura 6. Crecimiento de la cepa EC 18 en medio agar 5265 (ISP2), agar 5315 (ISP3), agar 5317 (ISP4), agar 5323 (ISP5) y agar 5322 (ISP7), Medio Complejo (MC), Medio harina de soya-manitol (SFM) y microscopía a 40x, a partir del medio agar 5265 (ISP2).
Productora del pigmento soluble.

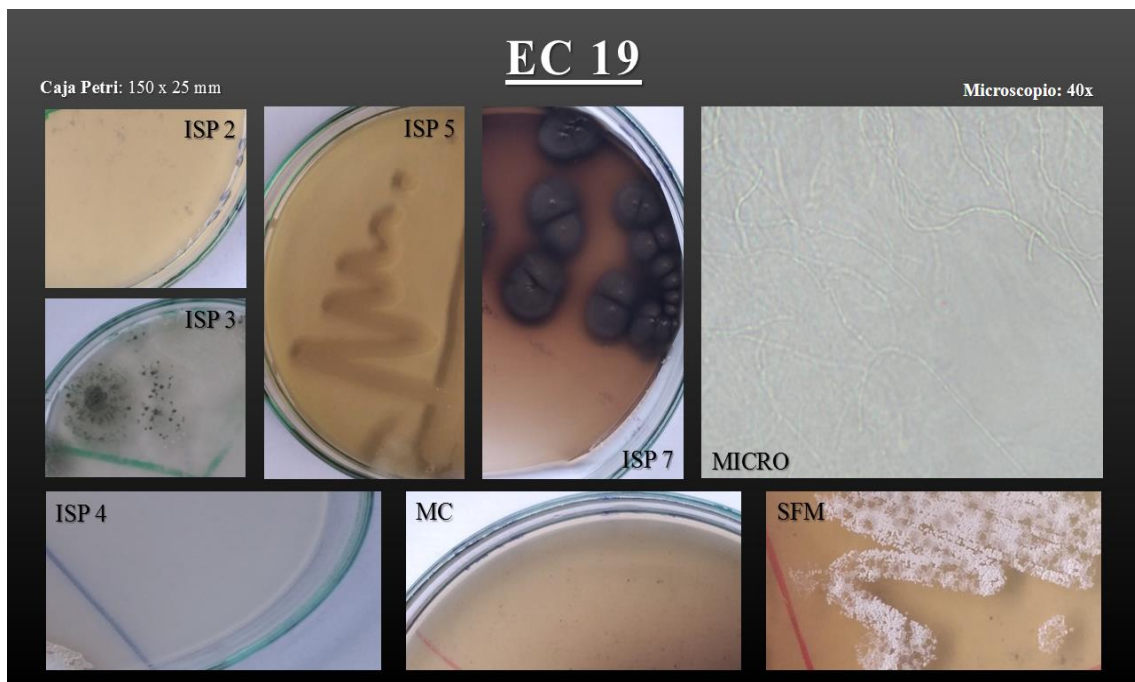


Figura 7. Crecimiento de la cepa EC 19 en medio agar 5265 (ISP2), agar 5315 (ISP3), agar 5317 (ISP4), agar 5323 (ISP5) y agar 5322 (ISP7), Medio Complejo (MC), Medio harina de soya-manitol (SFM) y microscopía a 40x, a partir del medio agar 5265 (ISP2).
Productora del pigmento soluble.

En las figuras presentadas anteriormente se muestra el crecimiento de cada una de las cepas en los siguientes medios: ISP 2, ISP 3, ISP 4, ISP 5, ISP 7, MC y SFM. También, se incluye una micrografía de estas. En los resultados obtenidos para cada una de las cepas, se observa que los medios ISP 2 e ISP 7 fueron los más propicios para el crecimiento de las actinobacterias. En estos medios, se logró el crecimiento de las seis y siete cepas analizadas, respectivamente.

A continuación, se realiza la descripción macroscópica de las cepas estudiadas en el medio agar 5322 (ISP 7), se incluirán características especiales en otros medios y las observaciones al microscopio. Se observó que la cepa EC 5 presentó bordes irregulares, la superficie es arrugada y la textura lisa, con una consistencia dura y elevación umbilicada. Esta cepa tiene la capacidad de producir el pigmento melanoide. En cuanto a los colores de las colonias, predominó el azul negruzco en los diferentes medios. En el análisis microscópico, se observaron cadenas irregulares de bastones ramificados, presentando también cadenas de esporas cortas.

La cepa EC 9, mostró una forma irregular con borde filamentoso, una superficie verrugosa y una elevación umbilicada. No tiene capacidad para producir el pigmento melanoide. El color de las colonias fue de un tono pardo pálido. Al microscopio, se observaron cadenas de bastones irregulares, no septadas y con esporas individuales.

Mientras que la cepa EC 13, exhibió una forma irregular, una superficie seca y desmenuzable con una textura lisa, no tiene capacidad para producir el pigmento melanoide. El color de las colonias fue de un tono pardo nuez. Sin embargo, en el medio agar 5317 (ISP4), se observó una textura blanda y mucoide, con crecimiento dentro del medio sólido. Microscópicamente, se logró identificar cadenas de bastones rectos con un micelio ramificado, pero no se observó presencia de esporas.

La cepa EC 15, presentó una forma irregular con borde filamentoso y una superficie verrugosa de textura lisa. Además, tuvo la capacidad de producir el pigmento melanoide en el medio agar 5322 (ISP 7). El color de las colonias que

predominó en los diferentes medios fue el azul negruzco. En el análisis microscópico, se observaron esporas individuales junto a cadenas irregulares de bastones.

La cepa EC 17, mostró un borde filamentosos de forma irregular y una superficie áspera. No produjo el pigmento melanoide. El color de las colonias fue de tono rojo negruzco. En el medio agar 5317 (ISP4), algunas colonias crecieron dentro del agar. En el microscopio presentó estructuras filamentosas sin formación de esporas.

La cepa EC 18, presentó una forma irregular, una textura blanda y mucoide. Produjo el pigmento melanoide en el medio agar 5322 (ISP 7). En el medio complejo (MC), se observó crecimiento dentro del medio agar. El color de las colonias que predominó en los medios utilizados fue negro intenso. En el análisis microscópico, se observaron estructuras filamentosas de bastones rectos sin presencia de esporas.

Por último, la cepa EC19, tuvo una forma irregular con borde filamentosos y una textura lisa con una consistencia dura, produjo el pigmento melanoide en el medio agar 5322 (ISP 7). El color de las colonias tuvo un tono Rojo negruzco. En el microscopio, se observaron estructuras filamentosas ramificadas no fragmentadas con presencia de cadenas de esporas.

Tabla 1. Resumen de la coloración del micelio y las colonias de cada cepa en distintos medios sembrados.

MEDIO	Cepa #	Color reverso	Micelio aéreo	Pigmento soluble
ISP 2	EC 5	RAL 1019 Beige agrisado	-	-
	EC 9	RAL 8028 Marrón tierra	RAL 7004 Gris señales	-
	EC 13	RAL 9003 Blanco señales	RAL 1019 Beige agrisado	-
	EC 15	RAL 1019 Beige agrisado	-	-
	EC 17	RAL 8024 Pardo beige	-	-
	EC 18	-	-	-
	EC 19	RAL 7008 Gris caqui	-	-
ISP 3	EC 5	-	-	-
	EC 9	RAL 7046 Gris tele 2	RAL 7040 Gris ventana	-
	EC 13	RAL 7011 Gris hierro	RAL 7037 Gris polvo	-
	EC 15	RAL 7005 Gris ratón	RAL 7043 Gris tráfico B	-
	EC 17	RAL 4012 Morado perlado	-	-
	EC 18	-	-	-
	EC 19	RAL 7022 Gris sombra	-	-
ISP 4	EC 5	RAL 7013 Gris parduzco	-	-
	EC 9	RAL 7004 Gris señales	RAL 7004 Gris señales	-
	EC 13	RAL 1035 Beige perlado	RAL 1019 Beige agrisado	-
	EC 15	RAL 7001 Gris plata	-	-
	EC 17	RAL 8019 Pardo grisáceo	-	-
	EC 18	-	-	-
	EC 19	-	-	-
ISP 5	EC 5	RAL 7012 Gris basalto	-	-
	EC 9	RAL 7024 Gris grafita	RAL 8019 Pardo grisáceo	-
	EC 13	RAL 7006 Gris beige	-	-
	EC 15	RAL 8022 Pardo negruzco	-	-
	EC 17	RAL 8028 Marrón tierra	RAL 7030 Gris piedra	-
	EC 18	RAL 1035 Beige perlado	RAL 7008 Gris caqui	-
	EC 19	RAL 8011 Pardo nuez	-	-
ISP 7	EC 5	RAL 5004 Azul negruzco	-	RAL 5004 Azul negruzco
	EC 9	RAL 8025 Pardo pálido	RAL 7015 Gris pizarra	-
	EC 13	RAL 8011 Pardo nuez	-	RAL 8025 Pardo pálido
	EC 15	RAL 5004 Azul negruzco	RAL 9023 Gris oscuro perlado	RAL 8022 Pardo negruzco
	EC 17	RAL 3007 Rojo negruzco	-	-
	EC 18	RAL 9005 Negro intenso	-	RAL 9005 Negro intenso
	EC 19	RAL 3007 Rojo negruzco	RAL 7044 Gris seda	RAL 5004 Azul negruzco
MC	EC 5	RAL 8017 Chocolate	-	-
	EC 9	RAL 8025 Pardo pálido	-	-
	EC 13	RAL 8025 Pardo pálido	RAL 7036 Gris platino	-
	EC 15	RAL 1011 Beige pardo	-	-
	EC 17	RAL 8025 Pardo pálido	RAL 7044 Gris seda	-
	EC 18	RAL 8025 Pardo pálido	RAL 8017 Chocolate	-
	EC 19	-	-	-
SFM	EC 5	RAL 1001 Beige	RAL 1019 Beige agrisado	-
	EC 9	RAL 7022 Gris sombra	RAL 9003 Blanco señales	-
	EC 13	RAL 7022 Gris sombra	RAL 7036 Gris platino	-
	EC 15	RAL 8028 Marrón tierra	-	-
	EC 17	RAL 1019 Beige agrisado	RAL 4009 Violeta pastel	-
	EC 18	RAL 7021 Gris negruzco	RAL 7037 Gris polvo	-
	EC 19	RAL 1019 Beige agrisado	-	-

Tabla 2. Resumen del crecimiento de cada cepa en distintos medios sembrados.

CEPA	MEDIOS						
	ISP 2	ISP 3	ISP 4	ISP 5	ISP 7	MC	SFM
EC 5	+	-	+	+	++	+	+
EC 9	++	++	++	++	++	++	++
EC 13	++	+	+	++	++	++	++
EC 15	++	++	++	++	++	+	++
EC 17	+	+	++	+	++	+	++
EC 18	-	-	-	++	++	++	+
EC 19	+	++	-	++	++	-	+

(-): Sin crecimiento; (+): Crecimiento moderado; (++) : Buen crecimiento.

5.2 TOLERANCIA AL pH

Tabla 3. Resumen del crecimiento de las cepas en el medio líquido 5265 (ISP2) con distintos niveles de pH.

Cepas	NIVELES DE PH										
	1,8	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
EC 5	-	-	+	+	++	++	++	++	+	-	-
EC 9	-	+	+	+	++	++	++	++	++	++	+
EC 13	-	+	+	+	++	++	+	++	++	+	+
EC 15	-	+	+	+	++	++	+	+	-	-	-
EC 17	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
EC 18	-	+	+	+	++	++	+	-	-	-	-
EC 19	-	+	+	+	++	++	++	++	++	+	+

“-”, Sin crecimiento; “+”, Crecimiento moderado; “++”, Buen crecimiento

El rango de crecimiento de los microorganismos depende de cada cepa estudiada. Existen tres tipos de microorganismos, según su pH óptimo de crecimiento: acidófilos, neutrófilos y alcalófilos (Jin y Kirk, 2018). En este caso, el pH óptimo de las actinobacterias se encuentra entre siete a ocho, presentando una amplia tolerancia a diferentes niveles de pH. En el marco de esta investigación, se observó que cuatro cepas (EC 9, EC 13, EC 17 y EC 19) fueron capaces de crecer en la mayoría de los niveles de pH estudiados, en un rango de pH de 3 a 12. Por otro lado, la cepa EC 5 mostró una tolerancia limitada a pH extremos, con un rango de pH de 4 a 10.

Además, se observó un óptimo crecimiento en los niveles de pH siete y ocho. Sin embargo, cabe destacar que las cepas estudiadas fueron recolectadas en piscinas de petróleo que presentan niveles ácidos de pH donde, a pesar de estas condiciones ácidas, las cepas lograron adaptarse al ambiente y desarrollaron la capacidad de crecer en entornos ácidos. Teniendo en cuenta esto, el pH puede afectar a la homeostasis y funcionalidad de sus sistemas metabólicos de la cepa. En el caso de no soportar pH demasiado ácidos se debe a que en estos niveles ciertas proteínas esenciales para su funcionamiento celular son desnaturalizadas y puede afectar la permeabilidad de la membrana celular, lo que le impide el transporte de nutrientes y pone en riesgo la integridad celular. En estas circunstancias, las células pueden activar sistemas de transporte de protones o bombas de protones para poder regular el pH interno (Suárez et al., 2004).

Por otro lado, un pH extremadamente alcalino suele producir cambios en la estructura y carga de las biomoléculas, afectando a la estabilidad y a su actividad enzimática, interfiriendo su regulación osmótica. Para contrarrestar los efectos dañinos de estos niveles de pH las células puedan sintetizar proteínas para estabilizar la membrana celular y poder regular el equilibrio iónico (Calvo y Martínez-Martínez, 2009).

En contraste con los resultados de la presente investigación, se puede afirmar que las cepas investigadas presentan tolerancias similares a las cepas descritas previamente en diferentes investigaciones. Como se resalta en el estudio de Chamorro (2018) el nivel de pH es importante para el crecimiento de actinobacterias pues las características de estos les permite crecer en casi todos los pH, menos en los alcalinos muy altos Y se constató que, pasando el pH 10, muchas cepas no tienen la capacidad de crecer. Esto se reflejó en los resultados de esta investigación, pues se encontró que tres cepas que fueron incapaces de crecer en rangos superiores a 10.

5.3 UTILIZACIÓN DE CARBOHIDRATOS

Tabla 4. Resumen de resultados de la utilización de diferentes carbohidratos como única fuente de carbono para el crecimiento de las cepas estudiadas, en el medio agar basal 5338.

CEPA#	CARBOHIDRATOS								
	Control (-)	Glucosa	Celulosa	Sucrosa	Arabinosa	Manitol	Inositol	Ramnosa	Rafinosa
EC 5	-	+	-	+	+	-	(+)	(+)	+
EC 7	+	-	(+)	(+)	-	(+)	-	+	++
EC 9	+	++	-	+	(+)	+	+	++	-
EC 13	-	(+)	++	++	+	+	++	+	+
EC 15	+	++	(+)	+	-	-	-	(+)	++
EC 17	+	-	-	-	-	-	-	-	-
EC 18	+	(+)	++	+	-	+	+	(+)	+
EC 19	+	+	+	+	(+)	+	-	+	-

“-”: Crecimiento no mejor que el control negativo; “(+)”: Crecimiento mejor que el control negativo, pero no como el control positivo; “+”: Crecimiento como el control positivo +; “++”: Crecimiento mejor que el control positivo.

Se determinó que, entre las cepas estudiadas, la sucrosa y ramnosa fueron los carbohidratos más utilizados. De las siete cepas analizadas, seis de ellas fueron capaces de metabolizar estos carbohidratos, lo que resultó en un buen crecimiento. En contraste, se observó que la arabinosa fue el carbohidrato menos utilizado, ya que solo cuatro cepas mostraron capacidad metabólica y su crecimiento fue moderado. Además, se pudo observar que la cepa EC 13 demostró capacidad metabólica para utilizar todos los carbohidratos estudiados, siendo la celulosa, el inositol y la sucrosa los que, promovieron un crecimiento superior al del control. Por otro lado, la cepa EC 17 no logró metabolizar ninguno de los carbohidratos analizados, característica que poseen ciertos géneros según el Manual de Bergey (Parte et al., 2012). En cuanto al control negativo, se observó que las cepas EC 9, EC 15, EC 17, EC 18 y EC 19 crecieron en medio agar basal sin la presencia de carbohidratos. Esta capacidad puede atribuirse a la capacidad adaptativa de estos microorganismos para sobrevivir en diversos ambientes con diferentes condiciones. Se puede especular que, debido a que el stock de micelio tenía glicerol 40%, lograron utilizarlo como fuente de carbono para obtener un crecimiento visible dentro del medio agar basal sin carbohidrato.



Figura 8. Crecimiento de la cepa EC 9 en medio agar 5338 (Basal) sin carbohidratos (control negativo).

5.4 IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS

A lo largo del tiempo, se ha observado un progreso significativo en la caracterización e identificación de microorganismos. Una de las áreas que ha experimentado una evolución notable es la tecnología de secuenciación de ADN, ya que permite obtener resultados más precisos, con una mayor velocidad y capacidad de discriminación en comparación con las técnicas antiguas (Rubio et al., 2020). Sin embargo, ciertas metodologías se consideran robustas y pueden aportar información valiosa, más allá de la taxonomía. Según la investigación de Kuster (1972), características como la utilización de azúcares, la producción de melanina y la producción de pigmentos solubles son métodos confiables y consistentes en la caracterización de actinobacterias, como es el caso de aquellas pertenecientes al género *Streptomyces*.

Tabla 5. Resumen de resultados de las características de cada cepa estudiada y su identificación.

CEPA #	Apariencia de las colonias		Apariencia microscópica	Formación de esporas	Características fisiológicas		Temperatura crecimiento	Identificación del Género
	Color	Morfología*			Carbohidratos	Tolerancia de pH		
EC 5	Beige, Gris, Azul y Chocolate dependiendo el medio de cultivo.	Circular, filamentosa, arrugada, lisa, consistencia dura.	Cadenas irregulares de bastones ramificados.	Cadenas de esporas cortas.	Sucrosa, Arabinosa, Inositol, Ramnosa y Rafinosa. Glucosa, Sucrosa, Arabinosa, Manosa, Inositol, Ramnosa y Rafinosa.	4 a 10	28 ± 2	<i>Actinomadura</i>
EC 9	Marrón, Gris y Pardo dependiendo el medio de cultivo.	Circular, filamentosa, verrugosa, lisa e irregular.	Cadenas de bastones irregulares no septadas.	Esporas individuales.	Glucosa, Celulosa, Sucrosa, Arabinosa, Manosa, Inositol, Ramnosa y Rafinosa.	3 a 11	28 ± 2	<i>Actinomadura</i>
EC 13	Blanco, Gris, Beige y Pardo dependiendo el medio de cultivo.	Irregular, filamentosa, áspera, desmesúrale y lisa. Colonias incrustadas.	Cadenas de bastones rectos con un micelio ramificado.	No esporulan.	Glucosa, Celulosa, Sucrosa, Arabinosa, Manosa, Inositol, Ramnosa y Rafinosa.	3 a 11	28 ± 2	<i>Actinomyces</i>
EC 15	Beige, Gris, Pardo y Azul dependiendo el medio de cultivo.	Irregular, filamentosa, verrugosa y lisa.	Cadenas irregulares de bastones.	Esporas individuales.	Glucosa, Celulosa, Sucrosa, Inositol, Ramnosa y Rafinosa.	3 a 9	28 ± 2	<i>Actinomadura</i>
EC 17	Pardo, Marrón, Rojo y Beige dependiendo el medio de cultivo.	Áspera, mucoide, irregular y lisas. Colonias incrustadas.	Hifas filamentosas con varillas cortas de cocos.	No esporulan.	Ninguna.	3 a 11	28 ± 2	<i>Streptomyces</i>

*Descripción en medio agar 5322 (ISP7).

Tabla 5. Resumen de resultados de las características de cada cepa estudiada y su identificación. (continuación...)

CEPA #	Apariencia de las colonias		Apariencia microscópica	Formación de esporas	Características fisiológicas		Temperatura crecimiento	Identificación del Género
	Color	Morfología*			Carbohidratos	Tolerancia de pH		
EC 18	Beige, Negro, Pardo y Gris dependiendo el medio de cultivo.	Irregular, filamentosa, blanda y mucoide. Colonias incrustadas.	Estructuras filamentosas de bastones rectos.	No esporulan.	Glucosa, Celulosa, Sucrosa, Manosa, Inositol, Ramnosa y Rafinosa.	3 a 8	28 ± 2	<i>Actinomyces</i>
EC 19	Beige, Rojo, Pardo y Gris dependiendo el medio de cultivo.	Irregular, filamentosa, granulosa y lisa con consistencia dura.	Estructuras filamentosas ramificadas no fragmentadas.	Cadenas de esporas	Glucosa, Celulosa, Sucrosa, Arabinosa, Manosa y Ramnosa.	3 a 11	28 ± 2	<i>Rhodococcus</i>

*Descripción en medio agar 5322 (ISP7).

En base al Manual de Bergey (Parte et al., 2012), se realizaron comparaciones entre las características descritas en dicho manual y las características observadas en las cepas estudiadas. Como resultado, se identificó que las cepas EC 5, EC 9 y EC 15 podrían corresponder al género *Actinomadura*, las cepas EC 17 podrían ser del género *Streptomyces*, mientras que las cepas EC 13 y EC 18 pueden pertenecer al género *Actinomyces* y, por último, la cepa EC 19, puede ser del género *Rhodococcus*

Tabla 6. Identificación de cepas según los resultados de la investigación.

CEPA #	Género
EC 5	<i>Actinomadura</i>
EC 9	<i>Actinomadura</i>
EC 13	<i>Actinomyces</i>
EC 15	<i>Actinomadura</i>
EC 17	<i>Streptomyces</i>
EC 18	<i>Actinomyces</i>
EC 19	<i>Rhodococcus</i>

En cuanto a las características macroscópicas, se observaron similitudes en la textura rugosa o mucosa, el abultamiento, los márgenes irregulares o circulares, y la sequedad o aspereza de las colonias. Algunas cepas estudiadas mostraron la característica de incrustarse dentro del agar, como se reporta en el Manual. Con relación al color de las colonias, se encontró que los colores blancos, gris, café y negro, junto con sus variaciones, predominaban en las cepas estudiadas, en contraste con el manual donde se mencionan más frecuentemente los colores grises, crema y blanco. Las características microscópicas también presentaron similitudes. El Manual menciona estructuras como ramificaciones, hifas fragmentadas y septadas, las cuales coinciden con los resultados de la investigación, donde todas las cepas estudiadas mostraron estas características, especialmente ramificaciones septadas a lo largo de la muestra. Además, se observó la formación de cadenas cortas de esporas con forma rizada, recta o espiral en ciertas ocasiones.

Los resultados obtenidos son consistentes con los géneros encontrados en ambientes contaminados con hidrocarburos. En el estudio realizado por Martínez y Quevedo (2015) sobre la eficiencia de la biorremediación de suelos contaminados

con petróleo por actinobacterias nativas de la provincia de Talara, región Piura, se lograron aislar cepas del género *Streptomyces*. Estas cepas fueron reconocidas por su micelio aéreo con esporóforos espiralados y no espiralados, observándose en ciertos casos espirales primitivos, abiertos y cerrados, también, como se indica en el Anexo 10.5, se mencionan características como la forma del micelio filamentoso y no septado. Según el anexo 5, el género *Streptomyces* puede no metabolizar ninguno de los carbohidratos estudiados, mientras que sus colonias presentan colores que van desde blanco hasta grisáceo y negro, con una superficie lisa y polvorienta. En la cepa EC 17, se encontró estas características. Por otro lado, según el manual de Bergey (Parte et al., 2012), las colonias de este género tienden a tener una textura áspera, seca y desmenuzable. Además, presentan colonias circulares e incrustadas. Dichas características concuerdan con los resultados obtenidos en presente investigación, resumidos en la tabla 5.

Rodríguez et al., (2019) describió características fenotípicas del género *Rhodococcus* en los aislados bacterianos obtenidos a partir de suelo con petróleo intemperado. Las colonias presentaban una forma circular, elevación elevada, borde entero y un tamaño medio, su superficie era lisa y su consistencia blanda de color naranja brillante. Estas características también fueron observadas en la cepa EC19, aunque en el medio agar 5322 (ISP7) exhibió un color rojo negruzco. Por otro lado, en el estudio de Vega (1998) dice que el género *Actinomadura* tiene la capacidad metabólica de utilizar manitol, glucosa, Xilosa, glicerol y celobiosa. Mientras que en el estudio de Hidrin et al. (2001) se menciona que el género *Actinomadura* forma filamentos ramificados aéreos que tiene cadenas de conidias que se fragmentan. Las cepas asignadas a este género poseen estas características morfológicas y fisiológicas.

Según Sánchez et al. (2004), el género *Rhodococcus* tiene la capacidad de ser utilizado como agente biológico y en la descontaminación y detoxificación de contaminantes en el medio ambiente. Por otro lado, el género *Streptomyces* tiene la capacidad de remover plaguicidas, como el lindano, presente en suelos contaminados (Fuentes, 2007). Según Romero (2021), el género *Actinomyces* tiene la capacidad de degradar el 98% de 10 litros de petróleo crudo durante 12 días. Por lo tanto, se recomienda continuar con el estudio de estas cepas para encontrar

diferentes aplicaciones biotecnológicas, principios bioactivos o su uso en la biorremediación ambiental.

En síntesis, después de analizar cada uno de los resultados y compararlos con la información bibliográfica se han identificado géneros de actinobacterias similares a los géneros previamente publicados en ambientes contaminados con hidrocarburos, y sus características similares. Así mismo, la descripción microscópica juega un papel fundamental en la caracterización de los microorganismos, ya que nos permite visualizar las estructuras biológicas en diferentes escalas y facilita una mejor diferenciación entre las cepas estudiadas (Guerra, 2004). Por otro lado, los estudios moleculares pueden confirmar la identificación, permitiendo clasificarlas a nivel de especie, lo cual no fue parte del presente estudio.

6. CONCLUSIONES

La interpretación de los resultados de caracterización morfológica y fisiológica da lugar a la identificación preliminar de los microorganismos aislados de una piscina de petróleo de la Amazonía ecuatoriana como pertenecientes a los géneros *Streptomyces*, *Actinomyces*, *Rhodococcus* y *Actinomadura*, todos englobados en el filo *Actinomycetota*.

Este estudio ha identificado cepas bacterianas capaces de habitar ambientes hostiles con condiciones extremas, como las piscinas de petróleo. Todas las cepas analizadas lograron sobrevivir en niveles de pH que oscilan entre ácido y básico en gran parte debido a las condiciones en las que fueron recolectadas. Además, la mayoría de las cepas mostraron la capacidad de formar esporas, lo cual es crucial para su supervivencia en condiciones desfavorables. Estos hallazgos resaltan la adaptabilidad y resistencia de las bacterias en entornos contaminados. Por otro lado, se observó que las cepas fueron capaces de metabolizar los carbohidratos característicos de cada uno de los géneros.

Al contrastar los resultados de la investigación con la información bibliográfica sobre géneros de actinobacterias provenientes de ambientes contaminados por hidrocarburos, se encontró que los géneros hallados en esta investigación coinciden con los reportados en otros estudios y sus características corresponden a las descritas en el Manual de Bergey (Parte et al., 2012)

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adam, D., Maciejewska, M., Naômé, A., Martinet, L., Coppieters, W., Karim, L., Baurain, D., y Rigali, S. (2018). Isolation, Characterization, and Antibacterial Activity of Hard-to-Culture Actinobacteria from Cave Moonmilk Deposits. *Antibiotics*, 7(2), 28. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7020028>
2. Alvarado, A. C. (2022). "Sinchiurco está cubierta de petróleo": la historia de la comunidad kichwa que enfrenta a PetroEcuador. Mongabay. Recuperado de <https://es.mongabay.com/2022/04/sinchiurco-esta-cubierta-de-petroleo-y-enfrenta-a-petroecuador/>
3. Aparicio, J. D. (2018). BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON Cr (VI) Y LINDANO POR ACTINOBACTERIAS [Tesis Doctoral]. Universidad Nacional de Tucumán.
4. Bautista, H. H. (2008). Frankia y la simbiosis actinorrízica. *Medigraphic*. 50 (3), 90 - 102. https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2008/mi08-3_4g.pdf
5. Björklöf, K., Karlsson, S., Frostegård, Å, y Jørgensen, K. (2009). Presence of Actinobacterial and Fungal Communities in Clean and Petroleum Hydrocarbon Contaminated Subsurface Soil. *The Open Microbiology Journal*, 3(1), 75-86. <https://doi.org/10.2174/1874285800903010075>
6. Bravo, E. (2007). Impactos de la explotación petrolera en Ecosistemas Tropicales y la biodiversidad. Recuperado de https://www.inredh.org/archivos/documentos_ambiental/impactos_explotacion_petrolera_esp.pdf
7. Calvo, J., y Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *ElSeiver*, 27(1), 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>
8. Carro, L. (2009). Avances en la sistemática del género *Micromonospora*: Estudio de cepas aisladas de la rizosfera y nódulos de *Pisum sativum*. [Tesis de doctorado]. Universidad de Salamanca
9. Castillo Rogel, Rosita T., More Calero, Francis J., Cornejo La Torre, Melitza, Fernández Ponce, Jaime N., y Mialhe Matonnier, Eric L. (2020). Aislamiento de bacterias con potencial biorremediador y análisis de comunidades bacterianas de zona impactada por derrame de petróleo en Condorcanqui

- Amazonas - Perú. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 22(3), 215-225. Recuperado de <https://dx.doi.org/10.18271/ria.2020.656>
10. Castro, D. (2019). Caracterización de bacterias que pueblan rambla salada (Murcia) y evaluación de su potencial para el control de infecciones fúngicas en el olivar [Tesis doctoral]. Universidad de Granada.
 11. Chamorro, J. P. (2018). Caracterización fenotípica de actinomicetes aislados de suelos contaminados con hidrocarburos (Tesis doctoral). Universidad Técnica de Ambato. <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/28373/1/BQ%20157.pdf>
 12. ColoresRAL. (2023). Recuperado de <https://www.coloresral.com.es/>
 13. De Pasquale, C., Palazzolo, E., Lo Piccolo, L., y Quatrini, P. (2012). Degradation of long-chain n-alkanes in soil microcosms by two actinobacteria. *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances y environmental engineering*, 47(3), 374–381. <https://doi.org/10.1080/10934529.2012.645786>
 14. Dhanasekaran, D., y Jiang, Y. (2016). *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications* (2.a Ed.). InTechOpen. <https://doi.org/10.5772/60457>
 15. Diferenciación de actinomicetos mediante el análisis de ácidos micólicos. (1998). [Grado de Maestría]. UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON. Recuperado de: <http://eprints.uanl.mx/7180/1/1080080893.PDF>
 16. Fuentes, M. (2007). Crecimiento y capacidad de remoción de lindano por *Streptomyces M7* en suelos contaminados. En XV Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades del Grupo de Montevideo (1.a ed., Vol. 1, pp. 1-14). Asociación de Universidades del Grupo de Montevideo. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/195025>
 17. García, J. M. (2021). Caracterización de Actinobacterias de zonas áridas y su efecto promotor de crecimiento en *Arabidopsis thaliana* y *Zea mays*. [Tipo de tesis para optar un grado, Universidad Autónoma de san Luis Potosí]. Repositorio Institucional. Recuperado de <https://repositorioinstitucional.uaslp.mx/xmlui/handle/i/7473>
 18. Gavilánez, T. C. (2013). Determinación de la biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para uso potencial en

- biorremediación (Tesis de doctorado). Recuperado de <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/6629/1/BQ%2038.pdf>
19. González Chavez, M. C. (2005). Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos. *Terra Latinoamericana*, 23(1), 29-37. <https://www.redalyc.org/pdf/573/57323104.pdf>
 20. Gordillo, A. B., y Decock, C. (2019). Multigene phylogenetic and morphological evidence for seven new species of *Aquanectria* and *Gliocladiopsis* (Ascomycota, Hypocreales) from tropical areas. *Mycologia*, 111(2), 299-318. <https://doi.org/10.1080/00275514.2018.1548863>
 21. Guerra, F. J. D. (2004). Técnicas de microscopía óptica. *Arbor: Ciencia, pensamiento y cultura*, (698), 225-258.
 22. Guerra, G. P. (2014). Aislamiento y estudio de la diversidad de las poblaciones de Actinobacterias presentes en muestras de compost. (Tesis de Grado). Recuperado de <https://gredos.usal.es/bitstream/handle/10366/125403/TFG%20Guillermo%20Pelaz%20AislamientoyEstudiodelaDiversidad.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=Las%20Actinobacterias%20son%20un%20grupo,Actinomycetales%20de%20la%20Clase%20Actinobacteria>
 23. Guevara, L. B. (2017). Aislamiento y caracterización morfológica de cepas nativas de actinomicetos y su actividad antagónica contra *Ralstonia solanacearum*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* sp. (Tesis de Grado). Recuperado de <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/15e34e89-5c0f-4cd5-a8a1-7544ecc88603/content>
 24. Hidrin, N., Goodfellow, M., Boiron, P., Moreno, M., y Serrano, J. (2001). Los estreptomicetos: Actualización y revisión didáctica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 21(1), 36-38. http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S1315-25562001000100006&script=sci_arttext
 25. Jiménez, D. (2011). Aislamiento y caracterización preliminar de genes de policétido sintetas tipo 1 en Actinomicetos aislados a partir de hormigas cortadoras de hojas *Atta cephalotes* [Trabajo de grado, Universidad Industrial de Santander]. Uis.

26. Jin, Q., y Kirk, M. F. (2018). pH as a Primary Control in Environmental Microbiology: 1. Thermodynamic Perspective. *Frontiers in Environmental Science*, 6(21). <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00021>
27. Kex to RAL. (2023). Recuperado de <https://hextoral.com/>
28. Küster, E. (1972). Simple Working Key for the Classification and Identification of Named Taxa Included in the International Streptomyces Project. *International journal of systematic bacteriology*, 22(3), 139-148. <https://doi.org/10.1099/00207713-22-3-139>
29. Martínez, D. S., y Quevedo, H. J. (2015). Eficiencia de la biorremediación de suelos contaminados con petróleo por Actinobacterias nativas de la provincia de Talara, región Piura. Repositorio UNPRG. <https://hdl.handle.net/20.500.12893/430>
30. Martínez, E., Quiñones, E., y Ricón, G. (2017). Potencial biotecnológico de las actinobacterias aisladas de suelos de México como fuente natural de moléculas bioactivas: compuestos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas. Universidad Tecnológica de la Mixteca. https://www.utm.mx/edi_anteriores/temas63/T63_E011-2017.pdf
31. Microsoft Corporation. (2023). Paint (Versión 10.0) [Software]. Recuperado de <https://apps.microsoft.com/store/detail/paint/9PCFS5B6T72H?hl=es-es&gl=es>
32. Mora, K., Araujo, S., Collahuazo-Reinoso, Y., López, Y., Rigaud, X., Carrión, A., y Gómez, N. (2020). Caracterización morfológica y fisiológica de microorganismos rizosféricos nativos de sistemas agroforestales de café. *Bosques Latitud Cero*, 10(2), 124-136. <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/832>
33. Murray, P. R. (2019). *Taxonomía microbiana. Microbiología médica básica*. (15-19). Elsevier. <https://clasesparticularesdebioquimica.files.wordpress.com/2016/05/cap-taxonomia-bailey-scott-2009.pdf>
34. Olajuyigbe, F. M., y Ehiosun, K. I. (2016). Assessment of crude oil degradation efficiency of newly isolated actinobacteria reveals untapped bioremediation potentials. *Bioremediation Journal*, 20(2), 133-143. <https://doi.org/10.1080/10889868.2015.1113926>

35. Panchenko, L. F., Kuzyanov, D. A., Pleshakova, Y. V., Pozdnyakova, N. N., Muratova, A., y Turkovskaya, O. V. (2022). Effect of Plant Root Exudate Constituents on the Degradation of Phenanthrene by the Rhizobacterium *Mycolicibacterium gilvum* (Mycobacteriaceae, Actinobacteria). *Biology bulletin of the Russian Academy of Sciences*, 49(10), 1958-1964. <https://doi.org/10.1134/s1062359022100284>
36. Parada, Romina B, Marguet, Emilio R, y Marisol, Vallejo. (2017). Aislamiento y caracterización parcial de actinomicetos de suelos con actividad antimicrobiana contra bacterias multidrogo-resistentes. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(2), 15-23. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.64098>
37. Parte, A., Whitman, W., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H., Trujillo, M., Ludwig, W., y Suzuki, K. (2012). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Actinobacteria* (2.a ed., Vol. 5). Springer. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-0-387-68233-4>
38. Quiñones Aguilar, E. E. (2019). Actinobacterias del suelo como potenciales bioherbicidas. CIATEJ. <https://ciatej.mx/el-ciatej/comunicacion/Noticias/Actinobacterias-del-suelo-como-potenciales-bioherbicidas/223>
39. Rodriguez, M., Rivera, M., y Peña, J. (2019). Aislamiento e identificación de bacterias nativas de gleysol con petróleo productoras de biosurfactantes. *Investigaciones científicas y agrotecnológicas para la seguridad alimentaria.*, 1, 408-416. https://www.researchgate.net/profile/Jorge-Herrera-19/publication/337756120_INVESTIGACIONES_CIENTIFICAS_Y_AGROTECNOLOGICAS_PARA_LA_SEGURIDAD_ALIMENTARIA_25-11-19/links/5de858b392851c83646293e2/INVESTIGACIONES-CIENTIFICAS-Y-AGROTECNOLOGICAS-PARA-LA-SEGURIDAD-ALIMENTARIA-25-11-19.pdf#page=408
40. Romero, L. (2021). Aislamiento de actinobacterias y hongos de sedimentos profundos del golfo de México y evaluación de su capacidad para biotransformar petróleo crudo pesado y extra-pesado [Tesis de doctorado]. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.

41. Rubio, S. J., Pacheco-Orozco, R. A., Gómez, A. M., Perdomo, S., y García-Robles, R. (2020). Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Universitas Medica*, 61(2). <https://doi.org/10.11144/javeriana.umed61-2.sngs>
42. Saez, J., Alvarez, A., Amoroso, M., y Benimeli, C. (2018). Actinobacterias: Su potencial para remover y degradar plaguicidas. En *Biorremediación de los recursos naturales* (pp. 32-60). INTA. https://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=&id=31728&capitulos=yes&detalles=yes&capit_id=8282673
43. Salam, L., Ilori, M. Amud, O., Liimien, Y. y Nojiri, H. (2017). Caracterización de la estructura de la comunidad bacteriana en un suelo africano tropical contaminado con hidrocarburos. *Environmental Technology*, 39:7, 939-951. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1317838>
44. Sánchez, N, Sandoval, AH, Díaz-Corrales, F, y Serrano, JA. (2004). El género *Rhodococcus*. Una revisión didáctica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 24(1-2), 24-33. Recuperado en 29 de mayo de 2023, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562004000100005&lng=es&tIng=es.
45. Suárez, C., Ramírez, F., Monroy, Alazard, D., y Fernández, L. (2004). La vida a altas temperaturas: adaptación de los microorganismos y aplicación industrial de sus enzimas. *Comunicaciones libres*, 1(1), 56-66. https://www.amc.edu.mx/revistaciencia/images/revista/55_1/lavida_altas_temperaturas.pdf
46. Shirling, E. B., y Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International journal of systematic bacteriology*, 16(3), 313-340. <https://doi.org/10.1099/00207713-16-3-313>
47. Uzcátegui-Negrón, Mayela, Serrano, José Antonio, Boiron, Patrick, Rodríguez-Nava, Verónica, Couble, Andrée, Moniée, Delphine, Sánchez Herrera, Karina, Sandoval, Horacio, Reviakina, Vera, Mercedes Panizo, María, y Mendoza, Mireya. (2009). Clasificación e identificación de especies de actinomicetos: Un estudio fenotípico comparativo. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(2), 91-97. Recuperado de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562009000200005&lng=es&tIng=es

48. Velásquez, A., Quintero, M., Jiménez, E., Blandón, L., y Gómez, J. (2018). MICROORGANISMOS MARINOS EXTREMÓFILOS CON POTENCIAL INTERES EN ESTUDIOS DE BIOPROSPECCIÓN. Universidad Nacional de Colombia. [http://portal.amelica.org/ameli/jatsRepo/115/115591003/html/#:~:text=Los%20extrem%C3%B3filos%20son%20microorganismos%20que,de%20pH%20\(Rubiano%2DLabrador%2C](http://portal.amelica.org/ameli/jatsRepo/115/115591003/html/#:~:text=Los%20extrem%C3%B3filos%20son%20microorganismos%20que,de%20pH%20(Rubiano%2DLabrador%2C)
49. Villalobos Flóres, J. G., y Niño Céspedes, G. A. (2020). CARACTERIZACIÓN DE CONSUMO DE HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO Y FIJACIÓN DE NITRÓGENO ATMOSFÉRICO POR KRIBBELLA SP NATIVA DEL PIEDEMONTE LLANERO [Tesis]. UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS.
50. Wink, J. M. (2012). Methods for the taxonomic description of the Actinobacteria (7). Braunschweig, Alemania: HZI. Recuperado de: https://www.dsmz.de/microorganisms/wink_pdf/Actinomethods.pdf

8. ANEXOS

ANEXO 1 COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Medio agar 5338 (Basal).

Medio Basal			
Sustancia (g)	Cantidades g/l	Preparación	
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,64	<u>Medio Líquido:</u>	<u>Medio Solido:</u>
KH ₂ PO ₄	2,38	Pesar sustancias en un vaso de precipitación. Disolver en el 80% del volumen final. Añadir oligoelementos y	Pesar agar y colocar en el recipiente en el que se va a esterilizar. Preparar caldo y
K ₂ HPO ₄	4,31	ajustar pH a 7.3. Ajustar al 90% volumen con agua. Esterilizar a 121°C durante 20	adicionar al mismo recipiente. Esterilizar a
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1,0	min. Disolver el carbohidrato en 10% del volumen de agua. Esterilizar con filtro.	121°C durante 20 min.
Solución Oligoelementos 2	1 mL		
Agar	15,0	Mezclar ambas soluciones.	

Medio agar 5265 (ISP2).

Medio ISP2			
Sustancia (g)	Cantidades g/l	Preparación	
Extracto de malta	10,0	<u>Medio Líquido:</u>	<u>Medio Solido:</u>
Extracto de levadura	4,0	Pesar sustancias en un vaso de precipitación, Disolver en el 80% del volumen final requerido. Medir con probeta, Ajustar pH a 7.2, Colocar en una probeta y completar el volumen con agua.	Pesar agar y colocar en el recipiente en el que se va a esterilizar, Preparar caldo y adicionar al mismo recipiente y
Glucosa	4,0		Esterilizar a 121°C durante 20 min.
Agar	15,0		

Medio agar 5315 (ISP3).

Medio ISP3			
Sustancia (g)	Cantidades g/l	Preparación	
Hojuelas de avena	20,0	<u>Medio Líquido:</u>	<u>Medio Solido:</u>
Agar	18,0	Cocer la avena en agua (volumen final) por 20 min. Filtrar con gasa.	Pesar agar y colocar en el recipiente en el que se va a esterilizar. Preparar caldo y
Solución elementos traza 3	2,5 mL	Añadir agua hasta restaurar volumen final. Añadir oligoelementos y ajustar pH a 7.2. Completar el volumen con agua.	adicionar al mismo recipiente. Esterilizar a 121°C durante 20 min.

Medio agar 5317 (ISP4).

Medio ISP4			
Sustancia (g)	Cantidades g/l	Preparación	
CaCO ₃	2,0	<u>Medio Líquido:</u>	<u>Medio Sólido:</u>
K ₂ HPO ₄	1,0	Disolver el almidón en una pequeña cantidad de agua	Pesar agar y colocar en el recipiente en el que se va a esterilizar. Preparar caldo y
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,0	caliente hasta que la mezcla sea homogénea. Anadir agua hasta el 50% del volumen final.	adicionar al mismo recipiente.
NaCl	1,0		
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0	Disolver los otros componentes en agua (40% del volumen final).	
Agua destilada	500,0	Mezclar ambas soluciones.	
Solución de sales traza 4	1,0	Añadir oligoelementos y ajustar pH a 7.2. Colocar en una probeta y completar el volumen con agua.	
Agar	20,0		

Medio agar 5323 (ISP5).

Medio ISP5			
Sustancia (g)	Cantidades g/l	Preparación	
L-asparaguina	1,0	<u>Medio Líquido:</u>	<u>Medio Sólido:</u>
Glicerol	10,0	Pesar sustancias en un vaso de precipitación. Disolver en el 80% del volumen final requerido. Medir con probeta. Añadir solución salina. Ajustar pH a 7.0-7.4. Colocar en una probeta y completar el volumen con agua.	Pesar agar y colocar en el recipiente en el que se va a esterilizar. Preparar caldo y adicionar al mismo recipiente.
K ₂ HPO ₄ anhidro	1,0		Esterilizar a 121°C durante 20 min.
Agar	20,0		
Solución salina	1 mL		

Medio agar 5322 (ISP7).

Medio (ISP7)			
Sustancia (g)	Cantidades g/l	Preparación	
Glicerol	15,0	<u>Medio Líquido:</u>	<u>Medio Sólido:</u>
L-Asparagine	1,0	Pesar sustancias en un vaso de precipitación. Disolver los constituyentes en 1L de H ₂ O. Ajuste el pH a 7,2 - 7,4. Estilizar en autoclave.	Pesar agar y colocar en el recipiente en el que se va a esterilizar. Preparar caldo y adicionar al mismo
L-Tyrosine	0,5		recipiente. Estilizar en autoclave.
K ₂ HPO ₄	0,5		
Fosfato dipotásico	0,5		
Sulfato de magnesio. 7H ₂ O	0,5		
Cloruro sódico	0,5		
Agar	20,0		
Sulfato ferroso x 7H ₂ O	0,01		

ANEXO 2 COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Solución 5342 DSMZ.

Solución oligoelementos 2	
Sustancias	Cantidades g/l
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,64
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,11
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,15
MnCl ₂ x 4H ₂ O	0,79

Solución 5314 DSMZ.

Solución elementos traza 3	
Sustancias	Cantidades g/l
CaCl ₂ x 2H ₂ O	3
Citrato férrico (Fe III)	1
MnSO ₄	0,2
ZnCl ₂	0,1
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,025
Tetraborato de sodio	0,2
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,004
Molibdato de sodio	0,01

Solución de sales traza 4.

Solución de sales traza 4	
Sustancias	Cantidades g/l
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,1
MnCl ₂ x 4H ₂ O	0,1
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,1

Solución Salina.

Solución salina	
Sustancias	Cantidades g/l
FeSO ₄ x 7H ₂ O	1
MnCl ₂ x 4H ₂ O	1
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	1

ANEXO 3 COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DE ANTIBIOTICO Y ANTIFUNGICO

ANTIFÚNGICO

Cicloheximida 50 ug/mL = 50 mg/L concentración final en el medio.

Preparación de stock:

Disolver 100 mg de cicloheximida >98% pureza en 2 mL de DMSO.

Filtrar por membrana de teflón o nylon de 0.22 um (usar jeringa y filtro pequeño).

Guardar en refrigeración en tubo de polipropileno y cubierto con Parafilm alrededor de la tapa.

Adicionar 1 mL de esta solución a 1 L de medio, en el momento previo al dispensado. Agitar bien.

ANTIBIOTICO

Ácido nalidixico: 50 ug/mL = 50 mg/L concentración final en el medio

Preparación de stock:

100 mg en 1 mL NaOH 0.5N hasta disolución, completar con 1 mL agua destilada.

Filtrar por membrana de teflón o nylon de 0.22 um (usar jeringa y filtro pequeño).

Guardar en refrigeración en tubo de polipropileno y cubierto con Parafilm alrededor de la tapa.

Adicionar 1 mL de esta solución a 1 L de medio, en el momento previo al dispensado. Agitar bien.

ANEXO 4 CRECIMIENTO DE CEPAS EN MEDIO LIQUIDO 5265 (ISP 2) CON DIFERENTES NIVELES DE PH.

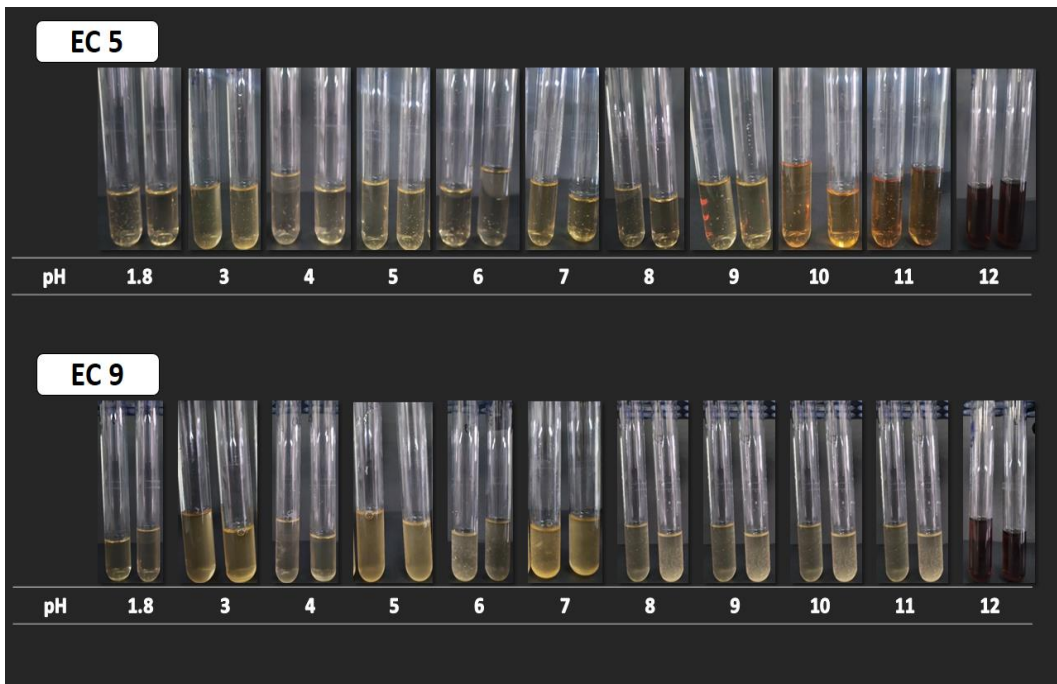


Figura 9. Crecimiento de cepas EC 5 y EC 9 en medio liquido 5265 (ISP 2) con niveles de pH entre 1,8 a 12.

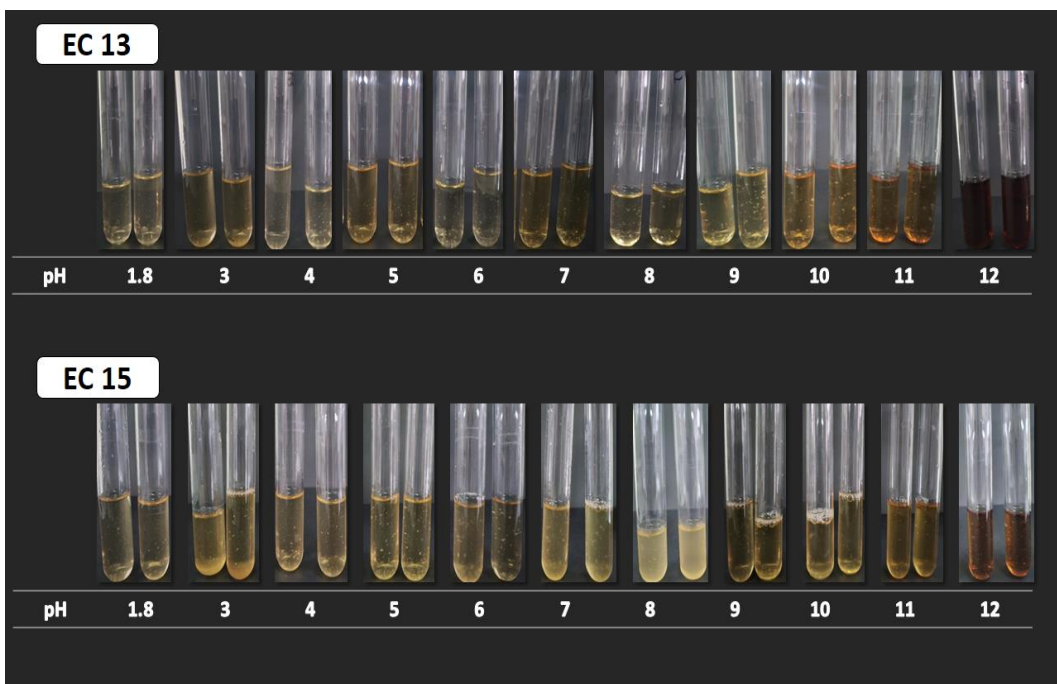


Figura 10. Crecimiento de cepas EC 13 y EC 15 en medio liquido 5265 (ISP 2) con niveles de pH entre 1,8 a 12.

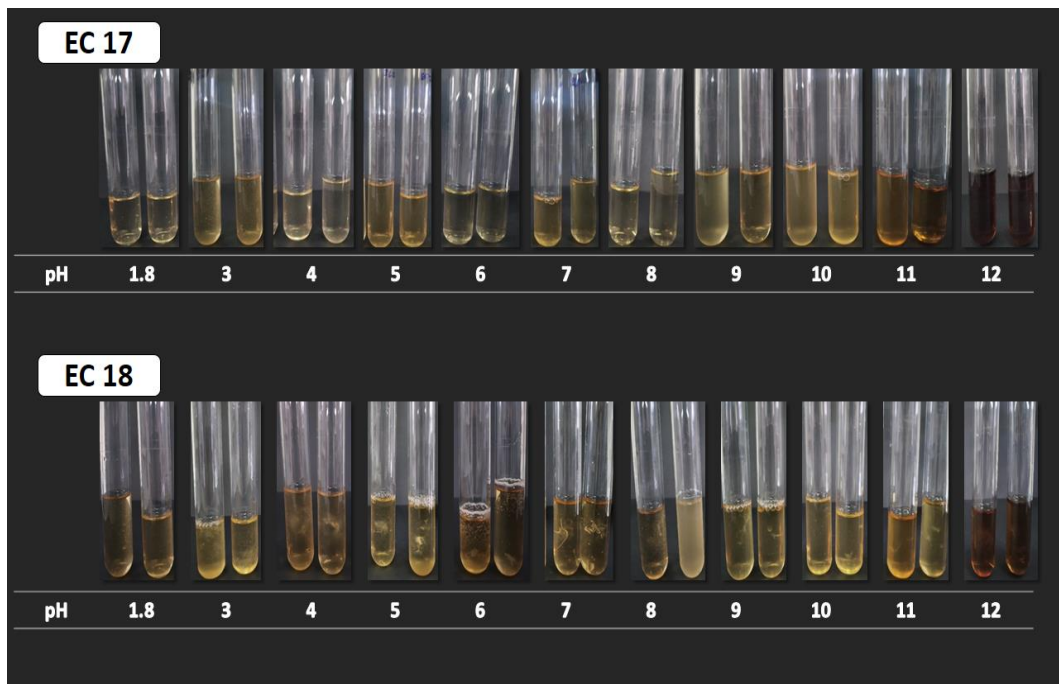


Figura 11. Crecimiento de cepas EC 17 y EC 18 en medio liquido 5265 (ISP 2) con niveles de pH entre 1,8 a 12.

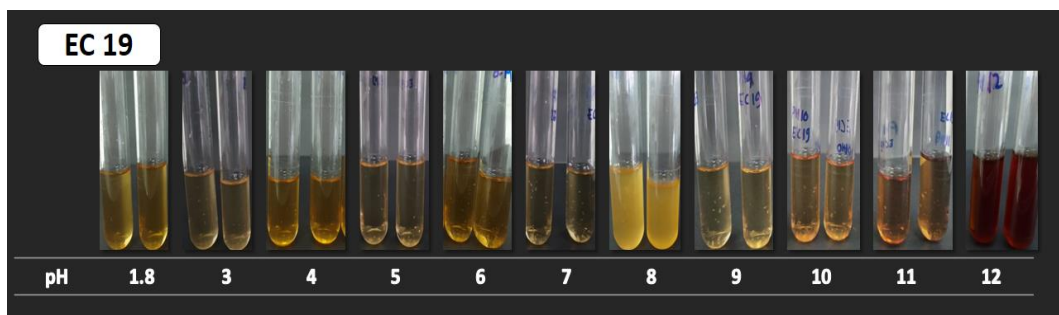


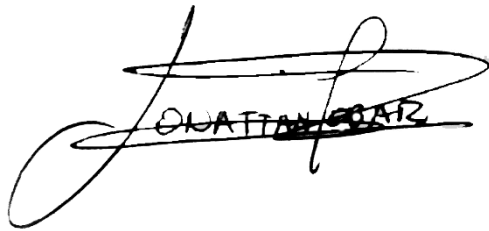
Figura 12. Crecimiento de cepas EC 19 en medio liquido 5265 (ISP 2) con niveles de pH entre 1,8 a 12.

**ANEXO 5 CARACTERÍSTICAS IMPORTANTES DE LOS PRINCIPALES GÉNEROS DE ACTINOBACTERIAS CONSIDERADOS
PARA LA IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS CEPAS.**

Género	Forma de las células	Forma del micelio	Características fisiológicas		%G-C	Formación de esporas	Tinción Gram	Apariencia de las colonias		Respiración	Temperatura crecimiento
			Azúcares	otros				Color	Textura		
<i>Rhodococcus</i> ^{44, 37}	Hifas fragmentadas en varillas cortas o cocos.	Ramificado.	Maltosa, manosa, sorbitol y sacarosa.	Acido-alcohol resistente.	67-73	No esporulan	Gram-positivas.	Beige, crema, naranja, rojo, amarillo e incoloras	Ásperas, lisas o mucoides y colonias incrustadas.	Aerobio estricto.	15-40°C
<i>Streptomyces</i> ^{25, 37}	Artrosporas aéreas.	Micelio aéreo con cadenas de artrosporas. Forman filamentos ramificados no fragmentados.	Sacarosa o glucosa. En ciertos casos no degrada.	No son ácido-alcohol resistente.	66-78	Cadenas cortas de esporas, esclerocios, picnidios, esporangios y sin nematos. Esporas no móviles.	Gram-positivas.	Blanco grisáceo, crema y negro.	Superficie lisa, con micelio aéreo, granuloso, pulverulento o aterciopelado. Colonias incrustadas	Aerobias.	25-35°C Algunas especies son psicrófilos o termófilas.
<i>Promicromonospora</i> ^{41, 37}	Hifas septadas y ramificadas.	Micelio fragmentado en formas no móviles, cocoide, en forma de "Y" o "V", bastones, diferidos o Clamidosporas	Glucosa, maltosa y sucrosa.	No son ácido-alcohol resistente.	70-75	Clamidosporas.	Gram-positivas.	Desde amarillo hasta blanco.	Cóncavas, arrugadas, lisas y pastosas.	Aerobias.	28-30°C
<i>Micromonospora</i> ^{9, 37}	Ramificadas y septadas.	Hifas aéreas ramificadas.	Fructosa, arabinosa, glucosa, sacarosa, celobiosa, galactosa, manosa, trehalosa y xilosa.	No ácido resistente	68-75	Esporas no móviles, sésiles o terminales en esporóforos cortos. Esporas individuales sobre el micelio.	Gram-positivas.	Amarillo pálido a naranja claro. Algunas desarrollan una pigmentación azul verdosa, marrón, naranja oscuro, púrpura o roja.	Colonias viejas incrustadas, lisas o mucosas.	Aerobio a microaerófilico.	20-40°C
<i>Kribella</i> ^{48, 37}	Hifas vegetativas ramificadas	Forma de bastoncillos o cocos.	L-Arabinosa, D-Galactosa, D-Xylosa, Inositol y Manitol.	No ácido resistente.	67-71,3	No esporulan.	Gram-positivas.	Sin coloración distintiva. El micelio aéreo es principalmente blanco o amarillo pálido.	Pastosas a blandas, a menudo con forma de líquen.	Aerobios.	28-30°C

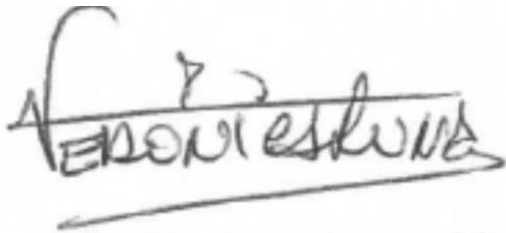
<i>Nocardia</i> ^{15, 37}	Hifas de sustrato rudimentarias a muy ramificadas.	Forma cocoide a bastoncillos.	D-Glucosa y arabinose.	Ácido- alcohol resistente.	63-72	No esporulan.	Gram-positivas a Gram-variables.	Tonos de naranja, rosa, rojo o amarillo.	Lisas o granulares e irregulares, arrugadas o apiladas.	Aerobios.	20-45°C
<i>Pseudonocardia</i> ^{26, 37}	Hifas de sustrato ramificadas.	Forma de varilla.	Arabinosa, Glucosa y Ramnosa.	Ácido- alcohol resistente.	68-79	Protación acropetal o por septación basipetal (fragmentación).	Gram-positivas.	De amarillento a marrón.	Abultadas.	Aerobios.	15-37°C
<i>Gordonia</i> ^{43, 37}	Bastoncillos y cocos cortos no móviles	Forma de "V" o en cadenas cortas.	Glicerol.	Catalasa positiva	63-69	No esporulan.	Gram-positivas a Gram-variables	Color crema, beige, amarillo claro o tostado hasta albaricoque, naranja, rosa o rojo	Convexo, brillante y liso. Áspero, mate y plegado con márgenes irregulares. Textura áspera y seca a desmenuzable o lisa.	Aerobios.	20-37°C
<i>Actinomyces</i> ^{35, 37}	Varillas rectas o ligeramente curvadas.	Ramificado y filamentoso.	Glucosa y fructosa.	No acido resistentes.	55-71	Si esporulan.	Gram-positivas a Gram-variables.	Color de blanco a blanco grisáceo o blanco cremoso.	Blanda a mucoide. Colonias incrustadas.	Facultativamente anaerobias, algunas crecen bien aeróbicamente	35-37°C
<i>Zhihengliuella</i> ^{11, 37}	Bastoncillos cortos		Maltosa, glucosa, sacarosa l-arabinosa y trehalosa.	Catalasa positiva y oxidasa negativa	66,5-70.3	No esporulan	Gram-positivas.	Amarillo pálido o blanco.	Opacas, circulares y lisas.	Aerobios.	27-29°C
<i>Mycobacterium</i> ^{36, 37}	Bastones ligeramente curvados o rectos.	Ramificado.	Glicerol.	Ácido-alcohol resistentes.	57-73	No esporulan.	Gram-positivas.	Color blanco a crema. Algunas de amarillo o naranja.	Lisas y rugosas.	Aerobios a microaerófila.	20-45°C
<i>Amycolatopsis</i> ^{4, 37}	Hifas de sustrato ramificadas	Formas cuadrangulares y bastoncillos	Arabinosa y galactosa	Catalasa positiva	66-75	Esporas cilíndricas, ocasionalmente ovoides, en cadenas rectas a flexuosas.	Gram-positivas.	Color azul y un pigmento difusible marrón claro.	Lisas.	Aerobios a anaerobios facultativos.	20-45°C Algunos mayores a 45°C
<i>Actinomadura</i> ^{45, 37}	Cadenas irregulares de bastones.	Extensamente ramificado y no fragmentadas.	Manitol, Rhamnose, Raffinose, Glucose y Arabinose.	Ácido- alcohol resistente.	66-73	Esporas individuales, cadenas rizadas en espiral o rectas.	Gram-positivas.	Azul, marrón, crema, gris, verde.	Irregular, rugosa, lisa, espinosa o verrugosa.	Aerobios	25-40°C

Firma del estudiante:

A handwritten signature in black ink. The signature is stylized and cursive, with the name 'JONATTAN TOBAR CIFUENTES' written in capital letters across the middle. The signature is written over a horizontal line.

Jonattan Daniel Tobar Cifuentes

Firma de la directora de disertación:

A handwritten signature in black ink. The signature is stylized and cursive, with the name 'VERÓNICA LUNA UNDA' written in capital letters across the middle. The signature is written over a horizontal line.

Mgtr. Verónica Luna Unda