

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

**Caracterización morfológica de actinobacterias aisladas de una
piscina de petróleo de la Amazonía ecuatoriana**

Disertación previa a la obtención del título de Microbiólogo

KEVIN ALEJANDRO GALLO CAISAPANTA

Quito, 2023

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de grado en Microbiología del Sr. Kevin Alejandro Gallo Caisapanta ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Mtr. Verónica Luna
Directora de la Disertación
Quito, día de junio de 2023

Eliza Jara-Negrete, M.Sc.
Co-directora de la Disertación
Quito, día de junio de 2023

DEDICATORIA

A mi familia, por apoyarme durante toda esta etapa de mi vida. Principalmente, a mis padres José Luis Gallo Hidalgo y Majorie Rosario Caisapanta Cárdenas por enseñarme a nunca rendirme y por estar para mí en los mejores y peores momentos. Gracias por enseñarme a ser la persona que soy hoy, mis principios, mis valores, mi perseverancia, mi empeño y mis logros se los dedico todo a ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco muy profundamente a M.Sc Eliza Jara-Negrete por su dedicación y paciencia, sin sus palabras y correcciones precisas no hubiese podido lograr llegar a esta instancia tan anhelada. Gracias por su guía y todos sus consejos, los llevaré grabados para siempre en la memoria en mi futuro profesional.

Agradezco a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) por fomentar los conocimientos. Además, a todas las personas pertenecientes al proyecto “Ecosistemas contaminados por petróleo como modelo de diversidad microbiana y reservorio para los procesos de biorremediación y biotecnología” por el financiamiento brindado para el desarrollo de esta disertación y por la ayuda en el resolvimiento de dudas y problemas que se presentaron.

A mis amigos:

Juan Fernando Bayas, por su amistad incondicional, por estar en los peores y mejores momentos de toda la carrera, te considero como un hermano y de igual manera agradezco todo lo que has hecho por mí no cabe duda de que me llevo a una gran persona en mi corazón. Gracias por siempre escucharme y nunca darte por vencido conmigo, por abrirme las puertas de tu casa y tratarme como alguien de tu familia.

Stephany Murillo, gracias por brindarme tu amistad desde primer semestre, gracias por cada risa, cada enojo, cada aventura, simplemente me quedo corto al expresarte mis más sinceras gracias por todo lo vivido. Gracias por tu forma de ser, por los consejos y por ser mi compañera de juegos y sobre todo gracias por demostrar que cuando más sientas que la vida te está dando la espalda siempre te puedes levantar y seguir adelante, además, tu perseverancia y el cómo logras superar todo lo que te propones es algo que admiro mucho en ti y estoy más que seguro que cumplirás todo lo que te propongas en un futuro.

José Yáñez, por siempre confiar en mí y saber decir las palabras correctas en los momentos donde peor la pasaba. Agradezco todo lo que has hecho por mí

y te considero como un hermano que ha demostrado ser real a pesar de las circunstancias.

Dylon Ramos, por ser un amigo incondicional, por el apoyo desde el inicio de la carrera y gracias por todo lo que has enseñado te considero un verdadero amigo en todo sentido de la palabra.

Jonattan Tobar, gracias por el apoyo brindado en toda la carrera te has convertido en un gran amigo en estos últimos meses y se la calidad de persona y de amigo que me llevo para toda la vida nunca cambies y sabes que cuentas conmigo para lo que sea.

Camila Nuñez, por todos los buenos momentos y estar para mí en todo momento, agradezco todo el tiempo que me brindaste y de igual manera agradezco el poder decir que eres una de las mejores personas que pude tener como amiga en esta carrera.

Francis Herrera, por ser una gran amiga a pesar de no ser muy social nos llevamos desde un inicio y logramos mantener una amistad bonita todo este tiempo.

Jerram Pozo, gracias por todo el apoyo brindado en toda la carrera, eres un gran amigo y he aprendido mucho de ti eres un ejemplo a seguir y nunca dudes de tus capacidades que vas a ser alguien importante en el futuro y estoy feliz de haber sido parte de tus amigos.

Francisco Vega, agradezco la amistad y los momentos vividos fuiste un gran amigo toda la carrera y agradezco que formáramos una amistad que sé que va a ser duradera, igual por la confianza brindada pese a todo.

Micaela Yépez, gracias por las risas y el apoyo durante toda la carrera eres una persona única y con una personalidad que no se compara con nadie espero poder verte graduándote al igual que todos y ver lograr tus metas.

LISTA DE ABREVIATURAS

g	Gramo
h	Hora
ISP	<i>International Streptomyces Project</i> (Proyecto Internacional Streptomyces)
L	Litro
MC	Medio complejo
min	Minuto
mg	Miligramo (1/1000 gramos)
mL	Mililitro (1/1000 litros)
rpm	Revoluciones por minuto
SFM	<i>Soy flour – Mannitol</i> (Harina de soya – Manitol)
µg	Microgramo (1/1000 000 gramos)
µL	Microlitro (1/1000 000 litros)

TABLA DE CONTENIDO

CERTIFICACIÓN.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
TABLA DE CONTENIDO	viii
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVO GENERAL.....	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
4. MATERIALES Y MÉTODOS	6
4.1 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE BACTERIAS.....	6
4.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y FISIOLÓGICA	7
4.2.1 DESCRIPCIÓN MORFOLOGÍA DE COLONIAS Y PRODUCCIÓN DE PIGMENTO MELANOIDE	7
4.2.2 UTILIZACIÓN DE CARBOHIDRATOS	8
4.2.3 TOLERANCIA AL PH	9
4.3 IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS.....	9
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
5.1 DESCRIPCIÓN DE COLONIAS Y PRODUCCIÓN DE PIGMENTO MELANOIDE	10
Figura 1. Cepa EC2: crecimiento en los medios agar 5265 (ISP2), agar 5315 (ISP3), agar 5317 (ISP4), agar 5323 (ISP5) y agar 5322 (ISP7), medio complejo (MC) y Medio harina de soya-manitol (SFM) y microscopía a 40x.....	10
Figura 2. Cepa EC 4 y crecimiento en los medios agar 5265 (ISP2), agar 5315 (ISP3), agar 5317 (ISP4), agar 5323 (ISP5) y agar 5322 (ISP7), medio complejo (MC) y Medio harina de soya-manitol (SFM) y microscopía a 40X.....	11

Figura 3. Cepa EC 7 y crecimiento en los medios agar 5265 (ISP2), agar 5315 (ISP3), agar 5317 (ISP4), agar 5323 (ISP5) y agar 5322 (ISP7), medio complejo (MC) y Medio harina de soya-manitol (SFM) y microscopia a 40X.....	11
Figura 4. Cepa EC 8 y crecimiento en los medios agar 5265 (ISP2), agar 5315 (ISP3), agar 5317 (ISP4), agar 5323 (ISP5) y agar 5322 (ISP7), medio complejo (MC) y Medio harina de soya-manitol (SFM) y microscopia a 40X.....	12
Figura 5. Cepa EC 14 y crecimiento en los medios agar 5265 (ISP2), agar 5315 (ISP3), agar 5317 (ISP4), agar 5323 (ISP5) y agar 5322 (ISP7), medio complejo (MC) y Medio harina de soya-manitol (SFM) y microscopia a 40X.....	12
Figura 6. Cepa EC 16 y crecimiento en los medios agar 5265 (ISP2), agar 5315 (ISP3), agar 5317 (ISP4), agar 5323 (ISP5) y agar 5322 (ISP7), medio complejo (MC) y Medio harina de soya-manitol (SFM) y microscopia a 40X.....	13
Figura 7. Cepa EC 20 y crecimiento en los medios agar 5265 (ISP2), agar 5315 (ISP3), agar 5317 (ISP4), agar 5323 (ISP5) y agar 5322 (ISP7), medio complejo (MC) y Medio harina de soya-manitol (SFM) y microscopia a 40X.....	13
Tabla 1. Resumen de características de cada cepa en distintos medios inoculados.....	15
5.2 TOLERANCIA AL PH.....	16
Tabla 2. Resultados del crecimiento de las cepas en el medio liquido 5265 (ISP2) con distintos niveles de pH.	17
5.3 UTILIZACIÓN DE CARBOHIDRATOS.....	17
Tabla 3. Uso de distintos carbohidratos como única fuente de carbono por parte de las cepas EC2, 4, 7, 8, 14, 16, 20.....	17
5.4 IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS.....	18
Tabla 3. Características importantes de cepas EC 2, 4, 7, 8, 14, 16 y 20 para asignación de género.....	20
6. CONCLUSIONES.....	25
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
8. ANEXOS.....	32
ANEXO 1: Composición y preparación de medios de cultivo.....	32
ANEXO 2: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES SUPLEMENTARIAS.....	34

ANEXO 3. Fotos de resultados de ensayo de pH	35
ANEXO 4. Características importantes de géneros de actinobacterias considerados para la identificación taxonómica de las cepas estudiadas	38

1. RESUMEN

Las actinobacterias pertenecen a un grupo de bacterias Gram positivas que se han logrado encontrar en una gran variedad de ecosistemas, incluyendo aquellos que muestran condiciones extremas. El objetivo principal de esta investigación fue lograr la identificación de especies de este filo en aislados provenientes de piscinas de petróleo de la Amazonía ecuatoriana a través de su descripción morfológica-fisiológica y contrastación con la literatura especializada. Las características que se evaluaron fueron: forma, textura y color a nivel macro en diferentes medios de cultivo, forma a escala micro, uso de carbohidratos como única fuente de carbono, tolerancia a distintos niveles de pH, producción de pigmento melanoide. Se realizaron ensayos con 7 aislados, que al microscopio presentaron formación de filamentos, mientras que en medios sólidos desarrollaron colonias de forma circular e irregular, con bordes filamentosos, texturas arrugadas, lisas y polvorosas. Estas características se compararon con el Manual de Bergey y bibliografía sobre actinobacterias aisladas en ambientes contaminados por hidrocarburos. Con base en este análisis, se identificó a todos los aislados como pertenecientes al filo Actinomycetota, donde los géneros más probables fueron *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Actinomadura* y *Actinomyces*.

Palabras clave: Actinobacterias, ambientes extremos, piscinas de petróleo, caracterización morfológica, caracterización fisiológica

2. ABSTRACT

Actinobacteria belong to a group of Gram-positive bacteria that have been found in a wide variety of ecosystems, including those that display extreme conditions. The main objective of this research was to identify species of this phylum in isolates from oil ponds in the Ecuadorian Amazon through their morphological-physiological description and comparison with specialized literature. The characteristics that were evaluated were: shape, texture and color in different culture media, micro-scale shape, use of carbohydrates as the only carbon source, tolerance to different pH levels, melanoid pigment production. Tests were carried out with 7 isolates, which under the microscope presented filament formation, while in solid media they developed circular and irregular colonies, with filamentous edges, wrinkled, smooth and dusty textures. These characteristics were compared with the Bergey Manual and literature on actinobacteria isolated in hydrocarbon-contaminated environments. Based on this analysis, all isolates were identified as belonging to the Actinomycetota phylum, where the most probable genera were *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Actinomadura*, and *Actinomyces*.

Keywords: Actinobacteria, extreme environments, oil ponds, morphological characterization, physiological characterization

3. INTRODUCCIÓN

Las Actinobacterias son un grupo de bacterias Gram positivas que en su mayoría se las localizan en la tierra, mar y en los sedimentos de lagos y ríos; cumplen un rol de suma importancia que se centra en la descomposición de materia orgánica (Quiñones, 2021). Otro rasgo importante de estos microorganismos es su uso biotecnológico, debido a que producen más de la mitad de los compuestos bioactivos presentes en la base de datos de antibióticos (López De Mesa et al., 2005). Además, este filo comprende un elevado contenido de G+C en su ADN y una gran diversidad de morfología que puede variar dependiendo del taxón, pueden producir células ramificadas, células móviles o inmóviles, estructuras miceliares complejas, etc. (Sáenz et al., 2018). Existen numerosas investigaciones acerca de actinobacterias y su gran potencial en biorremediación por lo que se ha visto como una alternativa promisoras para la depuración de sitios contaminados con diversos hidrocarburos, metales pesados y pesticidas (Aparicio et al., 2015).

La mejor opción en biorremediación es emplear bacterias endógenas, ya que están adaptadas a las condiciones ambientales del sitio contaminado (Sun et al. 2022). Por ello, es importante estudiar la diversidad microbiológica de sitios con presencia de hidrocarburos como, por ejemplo, las piscinas de petróleo. En estos sitios, la concentración de hidrocarburos es alta, lo cual afecta la relación de la biota con el agua. De acuerdo con la descripción de Gordillo y Decock (2019), las piscinas o estanques de petróleo son depósitos de petróleo de mala calidad que quedaron en la selva amazónica durante la década de 1980; con el tiempo, estas áreas fueron cubiertas por restos vegetales, cuya acumulación y descomposición resultó en un manto orgánico flotante recolonizado por plantas. Estas piscinas contaminadas por hidrocarburos han sido estudiadas y se han encontrado microorganismos capaces de sobrevivir y adaptarse en estas circunstancias que normalmente son mortales para estos, por lo que se les categoriza como un ambiente extremo (Moreno, 2019).

Para estudiar las cepas extremófilas es necesario aislarlas y luego describir su morfología y fisiología. Con ello, se puede obtener información puntual y fácil de interpretar en cuanto a cualidades como las redactadas por López (2005) por

ejemplo, tamaño de la célula, forma, estructura, requerimientos nutricionales para su crecimiento, crecimiento en medios de cultivo específicos para determinado microorganismo, color de la colonia, textura, técnica de sembrado, visualización al microscopio para dar detalles como su coloración Gram, pruebas bioquímicas para diferenciar entre géneros y entre especies de un mismo género, etc.

La información redactada por Parada et al. (2017) menciona que la identificación de los actinomicetos se la realiza de acuerdo con sus características de crecimiento macroscópicas ya puedan ser su textura, forma, color del micelio aéreo y del sustrato, y por la producción de pigmentos difusibles en los medios de cultivo, además de realizarse observaciones microscópicas mediante tinción Gram. Uzcátegui-Negrón et al. (2009) también mencionan que el uso de técnicas fenotípicas es útil para la identificación de actinobacterias, complementado con el análisis del comportamiento bioquímico y propiedades de degradación de ciertos sustratos. De los métodos ya mencionadas para la identificación de actinomicetos la investigación de González (2010) menciona que el uso de pruebas bioquímicas y moleculares son importantes actualmente, además de que ayudan a determinar características a nivel molecular y saber con mayor exactitud puntos como la composición del peptidoglicano, la relación de guanina-citocina en el ADN, etc.

La finalidad de esta investigación es poder resolver la duda de si existen actinobacterias en la capa de materia orgánica de una piscina de petróleo de la Amazonia ecuatoriana. Para lo cual se interpretará características fisiológicas y morfológicas de los microorganismos encontrados en este lugar, con el objetivo de responder a las preguntas: ¿Cuáles son las cepas del filo Actinomycetota que han logrado adaptarse en este ambiente contaminado por hidrocarburos ubicado en la Amazonia ecuatoriana? y ¿Qué características similares tienen estas actinobacterias en comparación con otras reportadas como provenientes de ambientes contaminados por hidrocarburos?

OBJETIVO GENERAL

Identificar géneros del filo Actinomycetota en aislados bacterianos provenientes de piscinas de petróleo de la Amazonía ecuatoriana mediante sus características morfológicas y fisiológicas para la evaluación de la diversidad de este hábitat extremo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Categorizar aislados microbianos como actinobacterias mediante su morfología y su capacidad para la utilización de ciertos carbohidratos, la tolerancia a distintos niveles de pH y la producción de melanina.
2. Contrastar las características de los microorganismos categorizados con géneros reportadas en artículos científicos y bases de datos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE BACTERIAS

Se trabajó con ocho cepas colectadas de la región del oriente del Ecuador, aisladas de suelo rizosférico de un estanque de petróleo ubicado en la provincia de Sucumbíos, cantón Lago Agrío, campamento Charapa, sitio descrito por Gordillo y Decock (2019).

La técnica usada para el aislamiento de las cepas fue la descrita en el protocolo de Adam et al. (2018) modificado, donde como primer paso, se suspendió 0.5 g de suelo en 50 mL de tapón fosfato 0.01 (pH 7,0), y se agitó esta mezcla en un vórtex durante 5 min y se incubó durante 90 min a 30°C, en agitación. Finalizado el tiempo de incubación se transfirió 8 mL del sobrenadante a un tubo cónico de centrifuga con capacidad de 15 mL, se centrifugó a temperatura ambiente durante 10 min a 3000 rpm. y se incubó nuevamente por 30 min a 30°C. Luego, se prepararon diluciones seriadas en base 10 hasta 10^{-2} y se inoculó 100 μ L de ambas diluciones en los medios sólidos ISP 5 y medio de nitrato de almidón (SN) con y sin suplemento de hidrocarburos (n-decano y tolueno). Las placas inoculadas se incubaron a 27°C durante 4 semanas; transcurrido el tiempo, se seleccionaron las colonias prometedoras para subcultivarlas hasta obtener cultivos puros que se almacenaron en medios sólidos a 4°C. De estas cepas puras se obtuvo el stock de micelio que se guardó en glicerol al 20% a -20°C.

Para la obtención del stock de micelio por un lado se preparó caldo ISP2 y por otro matraces Erlenmeyer con capacidad de 125 mL con diez a quince esferas de vidrio que servirán para evitar la aglutinación del micelio y se autoclavó. Dentro de la cabina de flujo laminar (BioBase HCM-400), se dispensó 50 mL del medio líquido ISP 2 en cada matraz procurando evitar contaminaciones. Se seleccionaron las colonias más sospechosas de ser actinomicetos para su inoculación dentro del caldo, esto se lo realizó con ayuda de un palillo estéril y depositándola en el medio de cultivo con movimientos de arriba hacia abajo evitando topar la boca del matraz. Se incubó en un agitador rotatorio Optic Ivumen System durante 72h a una temperatura de 28°C a 140 rpm. Finalizado el tiempo de incubación, se transfirió el

cultivo a un tubo cónico de polipropileno estéril (tipo Falcon) de 50 mL, bajo cámara de flujo laminar, para después llevarlo a centrifugar en una centrífuga Scientific MR23i a 3500 g durante 10 min a 4 °C; asimismo, bajo flujo laminar, se desechó el sobrenadante procurando no descartar el pellet. Se lavó dos veces con 10 mL de agua estéril; en cada lavado se agitó con vortex (Fisher Scientific G-560) durante 10s antes de centrifugarlo durante 10 min, 3500 g, 4°C. Para su almacenamiento, se colocaron 2 mL de agua y 2 mL de glicerol 40% estériles obteniendo una solución 1:1 que se mezcló con la suspensión del micelio y se transvasó a criotubos de 2 mL. De cada cepa se obtuvo dos criotubos, uno para usarlo como stock de trabajo (almacenado a -20°C) y el otro se guardó como respaldo a -80°C.

4.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y FISIOLÓGICA

Se seleccionaron protocolos del Instituto Leibniz DSMZ - Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares detallados por Wink (2012) para utilizarlos en la identificación de los microorganismos.

4.2.1 DESCRIPCIÓN MORFOLOGÍA DE COLONIAS Y PRODUCCIÓN DE PIGMENTO MELANOIDE

Se utilizó los siguientes medios de cultivo: medio complejo 5006, agar 5265 (ISP2), agar 5315 (ISP3), agar 5317 (ISP4), agar 5323 (ISP5) y agar 5322 (ISP7). La composición e indicaciones de cada medio se encuentran detallados en el Anexo 1. El ISP7 se lo empleó principalmente para la visualización del pigmento melanoide. Para la identificación de cada cepa se usó la siguiente nomenclatura, EC#, para proceder con su inoculación en cada medio sólido.

Después de autoclavar los medios de cultivo, en cámara de flujo laminar se añadió antifúngico (500 µL) y antibiótico (500 µL) a cada uno, para posteriormente dispensar de 25 a 30 mL en cada caja Petri. Cuando el medio se solidificó, se inoculó 20µL del stock de micelio a temperatura ambiente en cada medio de cultivo. Se selló con Parafilm cada caja y se incubó a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 7-10 días. Para la descripción de las características macro y microscópicas de cada cepa se tomó en cuenta:

- Micelio Aéreo (A): Se diferenció entre “buena formación (+)” y “formación escasa (-)”
- Color reverso (R): Color del micelio en el sustrato influenciado en ocasiones por un pigmento soluble. Los colores se describieron a través de códigos RAL, para lo cual primero se obtuvo el código RGB con ayuda del programa Microsoft Paint (versión 22H2, Windows 10). Se seleccionó una colonia en una fotografía y se registró los números RGB que posteriormente se convirtieron a código RAL (mediante RGB to RAL Converter, n.d.) para poder obtener el color más representativo para cada cepa.
- Crecimiento (G): Se interpretó como “buen crecimiento (++)”, “crecimiento escaso (+)” y “no crecimiento (-)”
- Pigmento Soluble (S): Solo si existió producción de pigmento soluble en el medio; también se describió con el código RAL.

Microscópicamente, se identificó principalmente el desarrollo de estructuras filamentosas llamadas también como micelio y presencia esporas. Se realizó la observación con y sin tinción Gram, con ayuda de un microscopio (Olympus BX53) con el lente de 40X y bajo contraste de fases en caso de placas sin tinción.

4.2.2 UTILIZACIÓN DE CARBOHIDRATOS

Esta etapa se basó en el método de Shirling y Gottlieb (1966). Donde se usó el agar basal 5338. Los carbohidratos empleados para este ensayo fueron: glucosa (dextrosa), sucrosa, manitol, rafinosa, ramnosa, inositol, arabinosa, celulosa y, como control negativo, el medio basal sin carbohidrato. Se preparó el agar basal conforme a lo indicado en el Anexo 1, tomando en cuenta el volumen de disolución del carbohidrato para obtener 1% como concentración final; se autoclavó (Tuttnauer 3870M) a 121°C durante 30 minutos. Antes de usar los carbohidratos se los diluyó con agua destilada y se los filtro mediante una jeringa con un filtro (Millex-GS) de 0,22 µm, en flujo laminar (BioBase HCM-400) se incorporó los carbohidratos al medio y se agregó antifúngico (cicloheximida 50 µg/mL, concentración final) y antibiótico (ácido nalidíxico 50 µg/mL, concentración final). Se mezcló el medio y se dispensó en cajas Petri. Luego, se inoculó 20 µL de cada cepa y se estrió con asa bacteriológica. Al finalizar, se sellaron las placas con Parafilm y se incubaron a

28 ± 2°C durante 10 días. Transcurrido el tiempo de incubación, se interpretó los resultados con los siguientes parámetros: Crecimiento igual que el control positivo (glucosa) (+), Crecimiento mayor que el control positivo (++) y sin crecimiento (-).

4.2.3 TOLERANCIA AL PH

Para este ensayo se usó el medio 5265 (ISP2) en caldo ajustado a distintos niveles de pH en rangos de 1,8 a 12,0 los cuales se prepararon usando soluciones de ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido de sodio (NaOH), se los midió con un pHmetro (Martini Mi 805). Después, se colocó 7 mL de medio en los tubos de ensayo y se etiquetaron con el nivel de pH correspondiente, se los autoclavó a 121°C durante 30 minutos. Se trabajó en cabina de flujo laminar (BioBase HCM-400) con los stocks de micelio ya temperado se inoculó 20 µL de la cepa dentro del medio líquido, por duplicado para cada pH. Luego, se llevó los tubos de ensayos a la incubadora Optic Ivumen System 0010115 y se los dejó a 28°C con 140 rpm durante 72 horas. La interpretación de resultados se basó en el crecimiento de micelio en el medio líquido ISP2 con los siguientes parámetros: Crecimiento (G): Se interpretó como “buen crecimiento (++)”, “crecimiento escaso (+)” y “no crecimiento (-)”

4.3 IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS

Se realizó una búsqueda de 20 artículos que mencionen géneros de actinobacterias capaces de sobrevivir en ambientes contaminados por hidrocarburos. Los datos más relevantes como: el sitio de extracción, el objetivo de estudio, las cepas/géneros reportados, metodología y caracterización fueron considerados para la comparación de las características morfológicas y fisiológicas reportadas con aquellas obtenidas en esta investigación a fin de determinar similitudes.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Gracias a la caracterización fisiológica de microorganismos también podemos diferenciar, clasificar e identificar entre distintos géneros o especies de un grupo de

microorganismos, para lo cual se considera ciertos parámetros, por ejemplo, su capacidad nutricional, productos metabólicos o su respuesta a diferentes condiciones ambientales (UnADM, 2017). La información proporcionada por estas características debe ser lo más detallada posible, debido a que mientras más información se aporte, esto servirá de más apoyo para las personas que usen esto para sus investigaciones y puedan tener un punto de referencia.

5.1 DESCRIPCIÓN DE COLONIAS Y PRODUCCIÓN DE PIGMENTO MELANOIDE

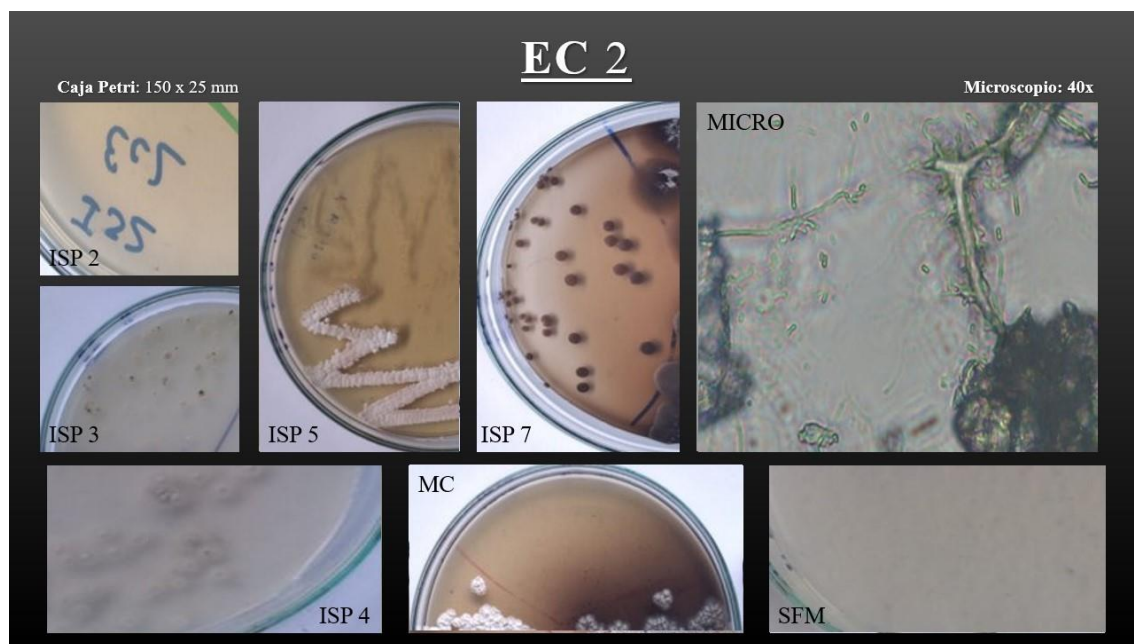


Figura 1. Cepa EC2: crecimiento en los medios agar 5265 (ISP2), agar 5315 (ISP3), agar 5317 (ISP4), agar 5323 (ISP5) y agar 5322 (ISP7), medio complejo (MC) y Medio harina de soya-manitol (SFM) y microscopía a 40x.

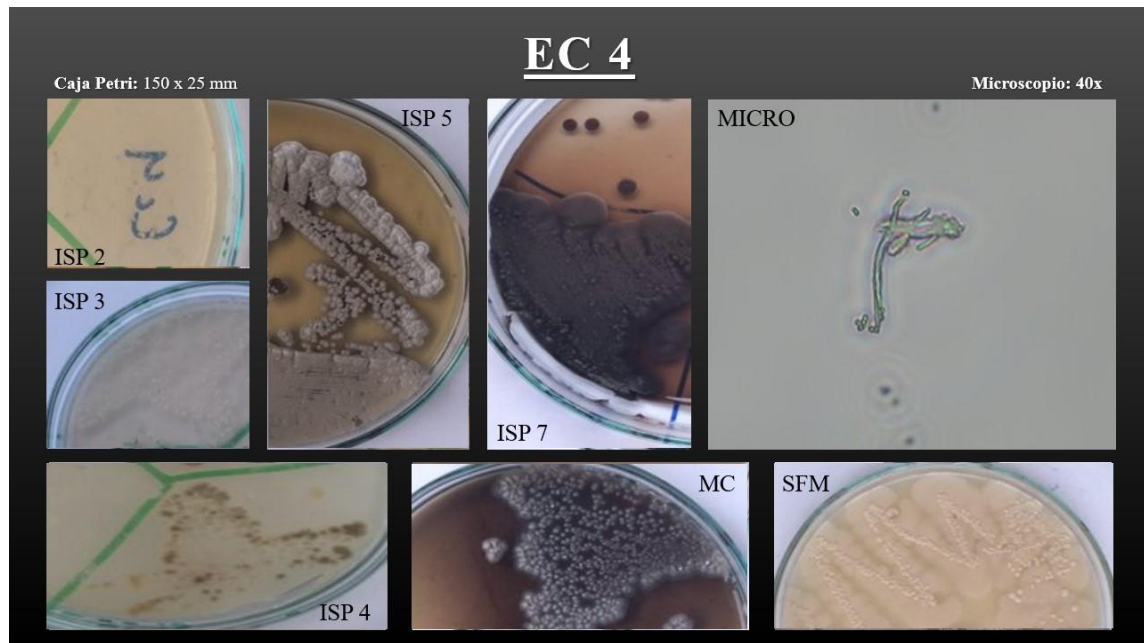


Figura 2. Cepa EC 4 y crecimiento en los medios agar 5265 (ISP2), agar 5315 (ISP3), agar 5317 (ISP4), agar 5323 (ISP5) y agar 5322 (ISP7), medio complejo (MC) y Medio harina de soya-manitol (SFM) y microscopia a 40X.

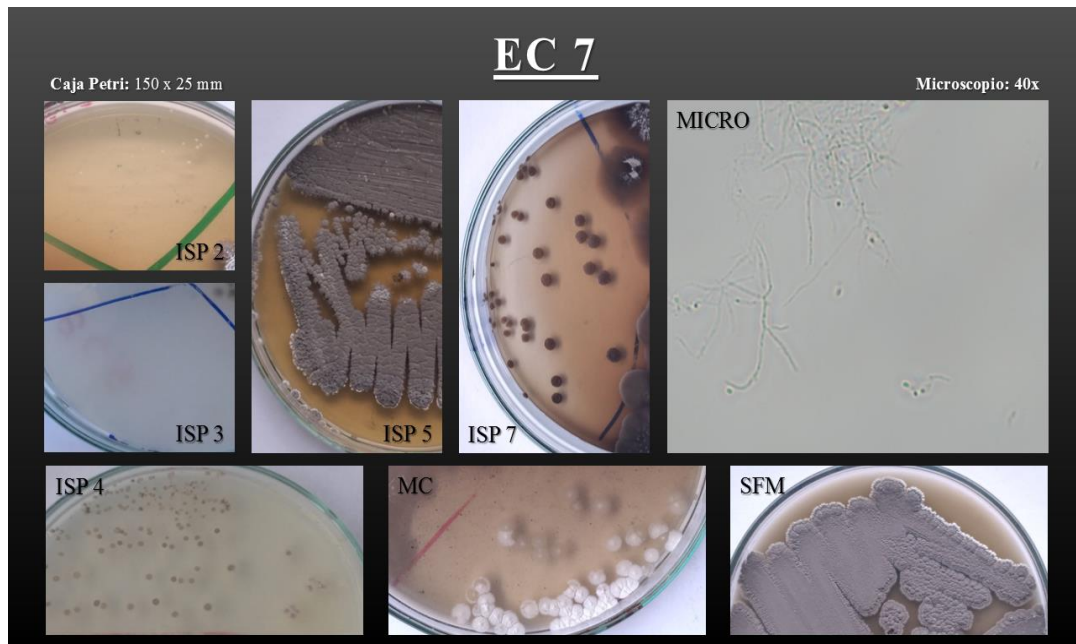


Figura 3. Cepa EC 7 y crecimiento en los medios agar 5265 (ISP2), agar 5315 (ISP3), agar 5317 (ISP4), agar 5323 (ISP5) y agar 5322 (ISP7), medio complejo (MC) y Medio harina de soya-manitol (SFM) y microscopia a 40X.

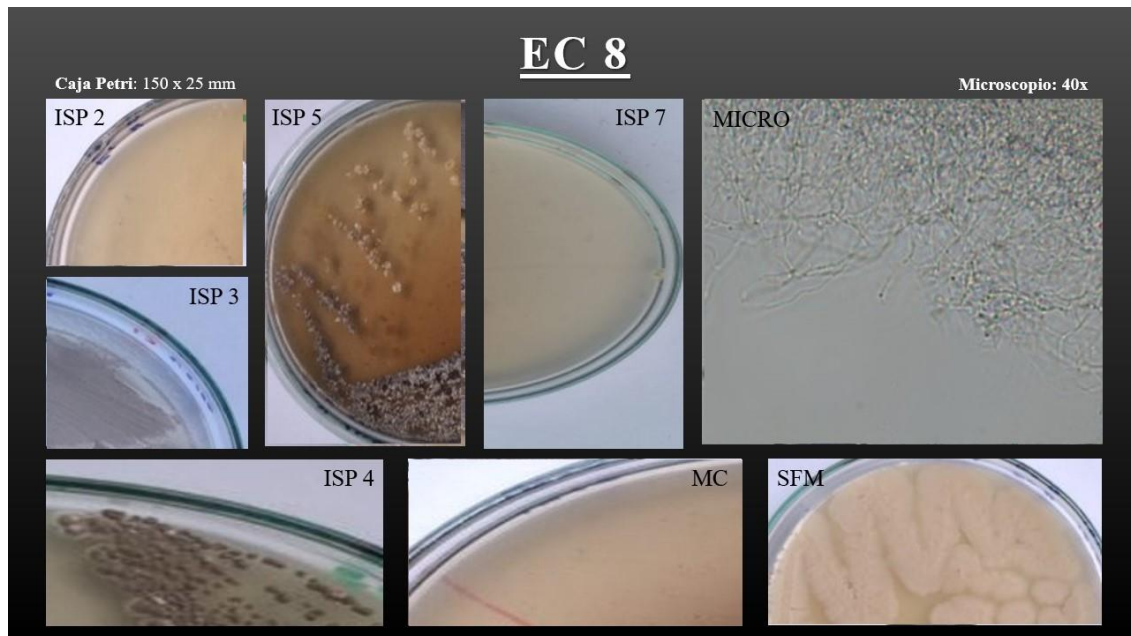


Figura 4. Cepa EC 8 y crecimiento en los medios agar 5265 (ISP2), agar 5315 (ISP3), agar 5317 (ISP4), agar 5323 (ISP5) y agar 5322 (ISP7), medio complejo (MC) y Medio harina de soya-manitol (SFM) y microscopia a 40X.

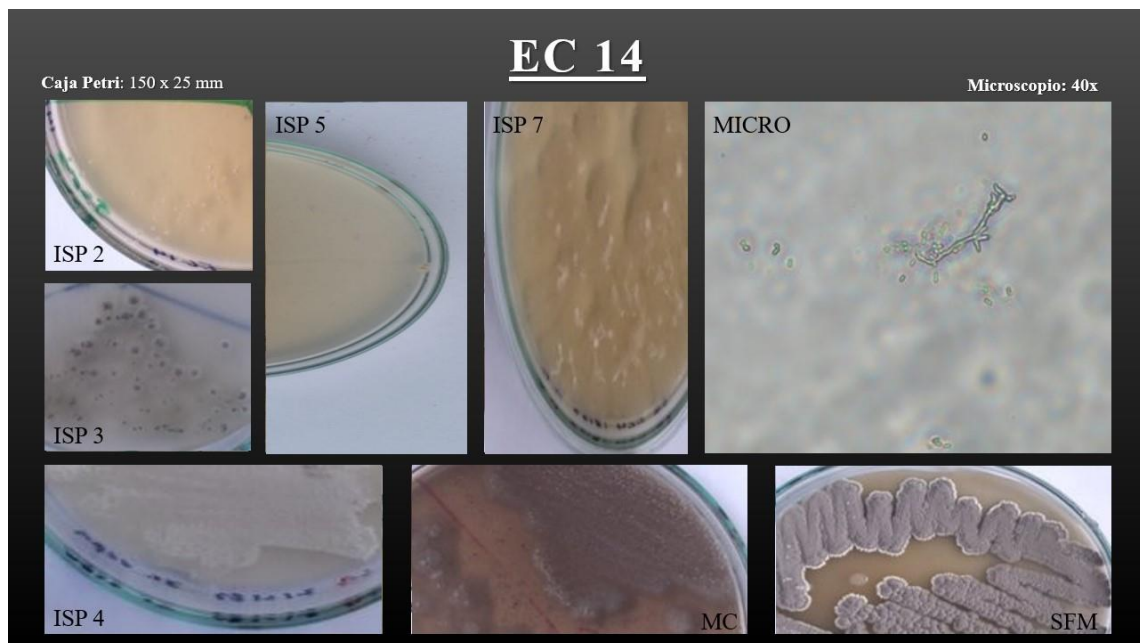


Figura 5. Cepa EC 14 y crecimiento en los medios agar 5265 (ISP2), agar 5315 (ISP3), agar 5317 (ISP4), agar 5323 (ISP5) y agar 5322 (ISP7), medio complejo (MC) y Medio harina de soya-manitol (SFM) y microscopia a 40X.

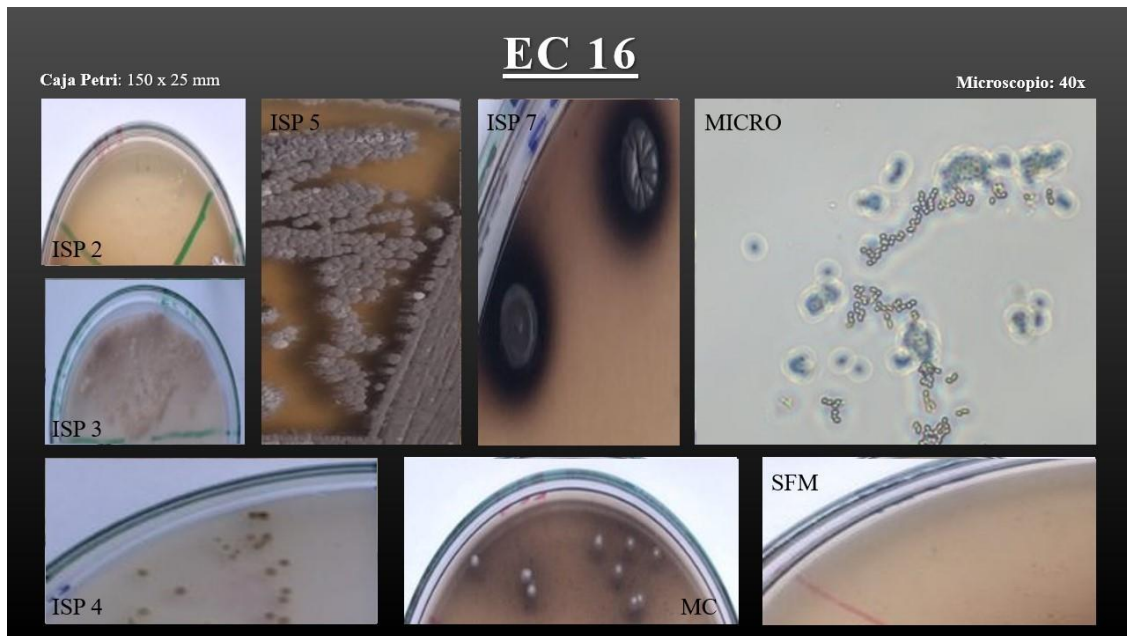


Figura 6. Cepa EC 16 y crecimiento en los medios agar 5265 (ISP2), agar 5315 (ISP3), agar 5317 (ISP4), agar 5323 (ISP5) y agar 5322 (ISP7), medio complejo (MC) y Medio harina de soya-manitol (SFM) y microscopía a 40X.

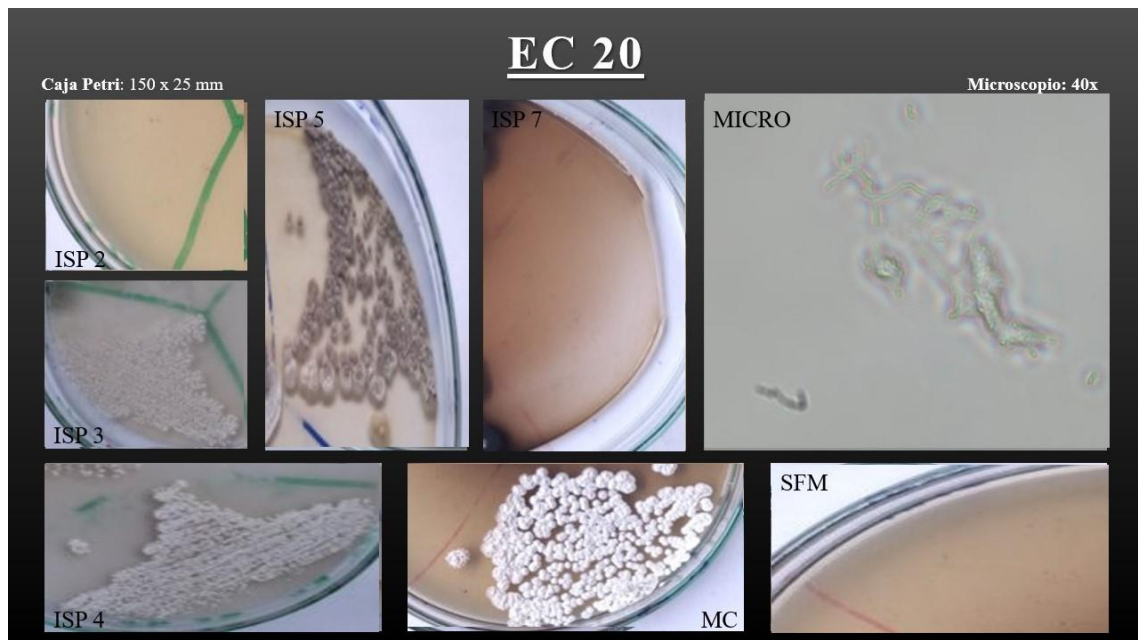


Figura 7. Cepa EC 20 y crecimiento en los medios agar 5265 (ISP2), agar 5315 (ISP3), agar 5317 (ISP4), agar 5323 (ISP5) y agar 5322 (ISP7), medio complejo (MC) y Medio harina de soya-manitol (SFM) y microscopía a 40X.

En las figuras anteriores se pueden observar el crecimiento de cada cepa en los siguientes medios: ISP2, ISP 3, ISP 4, ISP 5, ISP 7, MC y SFM. Además, se incluye una micrografía de cada una. Los resultados obtenidos dieron a conocer

que los medios ISP 4 e ISP 5 fueron los óptimos para el crecimiento de seis de las siete cepas analizadas. Por otro lado, el medio menos adecuado para el crecimiento de estas cepas fue el ISP 2 debido a que solo se observó crecimiento de tres de las siete cepas inoculadas.

Macroscópicamente, las cepas presentaron las siguientes características en medio sólido ISP 4: la cepa EC 2 presentó una formación de la colonia irregular puntiforme con borde ondulado, con una superficie convexa y de textura seca, de consistencia dura y brillante, además de la presencia de pigmento melanoide en medio ISP 7.

La cepa EC 4 mostró una forma irregular mediana con borde rizado, con una superficie pulvinada, una textura rugosa, de consistencia dura, opacas y con presencia del pigmento melanoide en los medios ISP 7 y MC.

La cepa EC 7 tuvo una forma circular pequeña con borde entero, una superficie convexa, con textura lisa, de consistencia suave, sin brillo y con la presencia del pigmento melanoide en el medio ISP 7 y presencia de pigmento soluble en medio SFM y ISP 5 de color gris y amarillento respectivamente. Además, esta cepa en medio SFM tiende a tener una textura aterciopelada.

La cepa EC 8 exhibió una forma irregular mediana con borde rizado, una superficie pulvinada, una textura rugosa, con consistencia dura, opaca y con presencia de pigmento soluble en medio ISP 5 pero ausencia de pigmento melanoide en los demás medios. En medio SFM creció de manera irregular y su consistencia fue mucoide.

Por su parte, la cepa EC 14 presentó una forma irregular puntiforme con borde ondulado, con una superficie elevada mucoide, una textura rugosa, de consistencia suave, sin brillo y con presencia de pigmento soluble en medio MC y ausencia de pigmento melanoide.

La cepa EC 16 tuvo una forma circular mediada con borde entero, su superficie convexa, de textura lisa, con consistencia dura, sin brillo y esta cepa de

igual manera presentó producción del pigmento melanoide en el medio ISP 7 y producción de pigmento soluble en el medio MC.

Por último, la cepa EC 20 presentó una forma rizoide pequeña con borde rizoide, con superficie elevada, con textura rugosa, consistencia suave, sin brillo y con producción de pigmento soluble en medio MC y de pigmento melanoide en medio IPS 7

Con respecto a, el análisis microscópico se observó estructuras filamentosas con formación de artrosporas aéreas en forma de cocos o varillas cortas en las cepas EC 2, 4, 14 y 16 (Figuras 1-6). Se observaron hifas en las cepas EC2, 4, 7, 8, 14 y 20. Asimismo, se visualizó filamentos microsifonados (diámetro menor a una micra) en los que se apreciaron algunas esporas de forma ovalada y de un tamaño reducido para las cepas EC 8, EC 16 y EC 20.

Tabla 1. Resumen de características de cada cepa en distintos medios inoculados

MEDIO	Cepa #	Crecimiento	Color reverso	Micelio aéreo	Pigmento soluble
ISP 2	Ec 2	-	-	-	-
	Ec 4	-	-	-	-
	Ec 7	+	RAL 7032 Gris guijarro	RAL 1014 Marfil	-
	Ec 8	+	RAL 9002 Blanco grisáceo	-	-
	Ec 14	-	-	-	-
	Ec 16	+	RAL 1020 Amarillo oliva	RAL 1014 Marfil	-
	Ec 20	-	-	-	-
ISP 3	Ec 2	+	RAL 7022 Gris sombra	-	-
	Ec 4	+	RAL 7037 Gris polvo	RAL 7037 Gris	-
	Ec 7	+	RAL 7036 Gris platino	RAL 7036 Gris platino	-
	Ec 8	+	RAL 7039 Gris cuarzo	RAL 7039 Gris cuarzo	-
	Ec 14	+	RAL 7043 Gris tráfico B	RAL 7037 Gris polvo	-
	Ec 16	-	-	-	-
	Ec 20	++	RAL 5014 Azul colombino	RAL 9023 Gris oscuro perlado	-
ISP 4	Ec 2	+	RAL 9023 Gris oscuro perlado	RAL 9023 Gris oscuro perlado	-
	Ec 4	++	RAL 8025 Pardo pálido	-	-
	Ec 7	+	RAL 7036 Gris platino	RAL 7036 Gris platino	-
	Ec 8	++	RAL 7003 Gris musgo	-	-
	Ec 14	+	RAL 7001 Gris plata	RAL 7001 Gris plata	-
	Ec 16	++	RAL 6013 Verde caña	-	-
	Ec 20	+	RAL 7039 Gris cuarzo	RAL 7037 Gris polvo	-
ISP 5	Ec 2	++	RAL 8003 Pardo arcilla	RAL 7006 Gris beige	-
	Ec 4	++	RAL 8022 Pardo negruzco	RAL 7013 Gris parduzco	-
	Ec 7	++	RAL 8007 Pardo corzo	RAL 7022 Gris sombra	-
	Ec 8	++	RAL 7037 Gris polvo	RAL 7037 Gris polvo	RAL 8003 Pardo arcilla

	Ec 14	-	-	-	-
	Ec 16	+	RAL 8022 Pardo negruzco	RAL 8022 Pardo negruzco	-
	Ec 20	+	RAL 8028 Marrón tierra	-	-
ISP 7	Ec 2	+	RAL 8017 Chocolate	RAL 3007 Rojo negruzco	RAL 8025 Pardo pálido
	Ec 4	++	RAL 5004 Azul negruzco	RAL 5004 Azul negruzco	RAL 9005 Negro intenso
	Ec 7	+	RAL 8016 Caoba	RAL 8016 Caoba	RAL 8024 Pardo beige
	Ec 8	-	-	-	-
	Ec 14	+	RAL 8028 Marrón tierra	-	-
	Ec 16	++	RAL 9005 Negro intenso	RAL 7015 Gris pizarra	RAL 5004 Azul negruzco
	Ec 20	+	RAL 3007 Rojo negruzco	RAL 3007 Rojo negruzco	RAL 8028 Marrón tierra
	Ec 2	-	-	-	-
MC	Ec 4	++	RAL 3007 Rojo negruzco	RAL 4012 Morado perlado	RAL 8022 Pardo negruzco
	Ec 7	+	RAL 1035 Beige perlado	RAL 9003 Blanco mate	-
	Ec 8	-	-	-	-
	Ec 14	++	RAL 8025 Pardo pálido	RAL 7039 Gris cuarzo	-
	Ec 16	+	RAL 1011 Beige pardo	-	-
	Ec 20	++	RAL 1011 Beige pardo	RAL 9003 Blanco mate	-
	Ec 2	+	RAL 7021 Gris negruzco	RAL 7021 Gris negruzco	-
SFM	Ec 4	++	RAL 1019 Beige agrisado	RAL 7032 Gris guijarro	-
	Ec 7	++	RAL 7024 Gris grafita	RAL 9023 Gris oscuro perlado	-
	Ec 8	++	RAL 1001 Beige	RAL 1019 Beige agrisado	-
	Ec 14	+	RAL 7022 Gris sombra	RAL 7022 Gris sombra	-
	Ec 16	-	-	-	-
	Ec 20	+	RAL 8011 Pardo nuez	-	-

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

En cuento a la producción del pigmento melanoide se reporta que las cepas EC2, EC4, EC7, EC16 y EC20 tienen la capacidad de producir dicho pigmento. Debido a la coloración de esta sustancia, se deduce que se trata del pigmento melanoide o melanina, sustancia que es parte de las características distintivas de las actinobacterias.

5.2 TOLERANCIA AL PH

Los resultados obtenidos en este ensayo demostraron que el rango de pH para el crecimiento de las cepas fue de seis a nueve. Se observó el crecimiento de las siete cepas dentro de rango. Asimismo, se registró lisis celular de las siete cepas en los pH 1.8, 11 y 12 debido a que se visualizó una nube homogénea diferente a micelio.

Tabla 2. Resultados 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 2	-	-	+	-	++	++	+	+	-	-	-
EC 4	-	+	+	++	++	++	++	++	+	-	-
EC 7	-	+	+	+	++	++	+	+	-	-	-
EC 8	-	+	+	++	++	++	++	++	+	-	-
EC 14	-	+	+	+	++	++	++	++	+	-	-
EC 16	-	+	+	++	++	++	++	++	+	-	-
EC 20	-	+	+	+	++	++	++	+	-	-	-

“buen crecimiento (++)”, “crecimiento escaso (+)” y “no crecimiento (-)”

El rango de crecimiento de las cepas estudiadas depende de cada una. Existen 3 tipos de microorganismos en los que se los puede clasificar como acidófilos, neutrófilos y alcalófilos, según el pH que prefieren. Se conoce que el rango de pH de las actinobacterias se encuentra entre 5 a 9 con un mejor desarrollo a pH neutro (González, 2010), por tanto, son neutrófilas. El estudio de Jin y Kirk (2018) indica que el pH puede afectar la termodinámica y a su vez la cinética de la respiración celular, además, el metabolismo de los microorganismos está controlado por distintos factores como la temperatura, salinidad, pH, disponibilidad de nutrientes y su ubicación geográfica. De todos los factores antes mencionados el pH es usado como control primario y, por si fuera poco, este también está estrechamente relacionado con las respuestas de las actividades metabólicas de las comunidades naturales a las variaciones en el pH ambiental. Teniendo esto en cuenta, mientras más bajo sea un pH el microorganismo va a necesitar de un mejor metabolismo y de más recursos de nutrientes para poder crecer dentro de un rango de pH ácido, igualmente con pH alcalino. Algo importante a aclarar es que el pH también afecta a las actividades enzimáticas extracelulares. Con los resultados obtenidos, se puede afirmar que cada cepa exhibió similitudes a cepas descritas previamente en distintas investigaciones. Como ejemplo de esto, se observó una tolerancia de pH similar a lo obtenido en el género *Actinomyces*, donde las cepas no presentaron ningún crecimiento en pH 10 (Chamorro, 2018). Al igual que las cepas estudiadas donde tres cepas fueron incapaces de crecer en rangos superiores a 10.

5.3 UTILIZACIÓN DE CARBOHIDRATOS

Tabla 2. Uso de distintos carbohidratos como única fuente de carbono por parte de las cepas EC2, 4, 7, 8, 14, 16, 20.

CEPA	CARBOHIDRATOS								
	Contro l	Glucosa	Celulosa	Sucrosa	Arabinosa	Manito l	Inosito l	Ramno sa	Rafin osa
EC 2	-	-	-	+	-	-	+	-	-
EC 4	(+)	-	+	++	+	+	+	+	++
EC 7	(+)	-	+	++	-	+	-	+	++
EC 8	-	-	++	-	-	-	+	-	+
EC 14	-	+	++	+	-	-	-	+	+
EC 16	-	+	++	+	+	-	+	+	+
EC 20	(+)	+	+	++	-	+	-	+	++

Crecimiento igual que el control positivo (glucosa) (+), Crecimiento mayor que el control positivo (++) y sin crecimiento (-). Para el crecimiento en control negativo se interpretó de la siguiente manera: Crecimiento en medio sin fuente de C –control negativo “(+)”

La lectura se realizó usando una comparación con un control negativo que este caso fue el medio basal sin carbohidratos, mediante el cual se determinó que las cepas analizadas metabolizan mayormente la sucrosa, rafinosa y celulosa. Asimismo, el carbohidrato menos utilizado fue la arabinosa donde solo dos cepas lograron metabolizarla y crecer moderadamente.

5.4 IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS

Las técnicas para la caracterización e identificación de microorganismos han evolucionado de forma significativa a lo largo del tiempo. Si bien se han desarrollado metodologías más sensibles y precisas para obtener información más detallada del microorganismo a estudiar, no se descarta el uso de métodos estandarizados basados en la morfología y fisiología debido a que estos son en muchos casos más visuales, rápidos y económicos que los métodos de nueva generación.

En el anexo 4 se detallan las características de algunos géneros de actinobacterias de acuerdo con lo descrito por Whitman et al. (2012). Se condensó esta información con base en 20 artículos científicos que reportan actinobacterias en suelos contaminados con hidrocarburos, considerando que existe mayor probabilidad de encontrar alguno de estos géneros en los aislados provenientes de la piscina de petróleo en estudio. Los resultados descritos sugieren que las cepas EC 2, 4, 14 pertenecen al género *Streptomyces*, mientras que la cepa EC 8 sería *Rhodococcus sp.*, las cepas EC 7 y 16 se identificaron con el género *Actinomyces*,

mientras que la cepa EC 20 tiene similitudes con el género *Actinomadura*. Esta identificación deberá ser corroborada con análisis molecular en el futuro, lo que, seguramente, además permitirá llegar a nivel de especie.

El primer punto para destacar es que, todas las cepas estudiadas, son Gram positivas. Otra razón por lo que se las identifican con los géneros mencionados es el hecho de que presentan la forma celular característica de estos géneros siendo estos en forma de cocos, barrillas, como artrosporas y como barrillas curvadas. La presencia de esporas es otra característica clave ya que algunos géneros no las presentan y es fácil guiarse. De igual manera, la textura y los colores son otras características para poder identificar a cada género. Los colores que más se repitieron fueron las tonalidades crema, beige, negras, marrones y blanco grisáceo. Las texturas fueron mayormente ásperas, lisas o mucoides; las cepas que presentaran crecimiento de micelio aéreo tuvieron una textura pulverulenta, granulosa o aterciopelada.

Tabla 3. Características importantes de cepas EC 2, 4, 7, 8, 14, 16 y 20 para asignación de género

Cepas	Forma de células	Forma de micelio	Características fisiológicas		Formación de esporas	Apariencia de colonias		Temperatura de crecimiento	Género asignado
			Azúcares	Otros		Color	Textura		
EC 2	Estructuras filamentosas con formación de artrosporas aéreas en forma de cocos o varillas	Ramificado y con hifas	Metaboliza: Sucrosa e Inositol	Crecimiento en pH: 4, 6, 7, 8, 9	No esporulan	Gris	Lisas, con micelio aéreo tienen a ser rugosas y aterciopeladas	28°C	<i>Streptomyces</i>
EC 4	Estructuras filamentosas con formación de artrosporas aéreas en forma de cocos o varillas	Ramificado y con hifas	Metaboliza: Celulosa, Sucrosa, Arabinosa, Manitol, Inositol, Ramnosa y Rafinosa	Crecimiento en pH: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	No esporulan	Gris, azul y morado perlado dependiendo del medio	Rugosa, lisas y mucoides dependiendo del medio de cultivo	28°C	<i>Streptomyces</i>
EC 7	Varillas rectas o curvadas	Filamentosos, ramificados y con hifas	Metaboliza: Celulosa, Sucrosa, Manitol, Ramnosa y Rafinosa	Crecimiento en pH: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9	No esporulan	Marfil, gris, caoba, blanco y gris dependiendo del medio de cultivo	Seca, rugosa y aterciopelada	28°C	<i>Actinomyces</i>
EC 8	Varillas rectas o curvadas	Filamentosos, ramificados y con hifas	Metaboliza: Celulosa, Inositol, Rafinosa	Crecimiento en pH: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	Filamentosos microsifonados con presencia de esporas en forma ovalada y de tamaño reducido	Gris y beige	Lisas, mucosas, secas y rugosas	28°C	<i>Rhodococcus</i>

EC 14	Estructuras filamentosas con formación de artrosporas aéreas en forma de cocos o varillas	Ramificado y con hifas	Metaboliza: Glucosa, Celulosa, Sucrosa, Ramnosa y Rafinosa	Crecimiento en pH: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	No esporulan	Gris y beige	Lisas, mucosas, secas, aterciopelada	28°C	<i>Streptomyces</i>
EC 16	Artrosporas aéreas en forma de cocos o varillas	Filamentosos y ramificados	Metaboliza: Glucosa, Celulosa, Sucrosa, Arabinosa, Inositol, Ramnosa y Rafinosa	Crecimiento en pH: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	Filamentos microsifonados con presencia de esporas en forma ovalada y de tamaño reducido	Marfil, gris, pardo y azul	Rugosas, lisas y verrugosas	28°C	<i>Actinomyces</i>
EC 20	En bastoncillos irregulares	Ramificado y con hifas	Metaboliza: Glucosa, Celulosa, Sucrosa, Manitol, Rafinosa y Ramnosa	Crecimiento en pH: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9	Filamentos microsifonados con presencia de esporas en forma ovalada y de tamaño reducido	Blanco mate, rojo negruzco y gris dependiendo el medio	Rugosas y lisas	28°C	<i>Actinomadura</i>

El género *Rhodococcus* se ha reportado en ambientes marinos contaminados por hidrocarburos. Romero (2011) realizó ensayos de degradación de hidrocarburos y vio que existe una mayor eficacia al formar consorcios junto con *Gordonia sp.* y *Pseudomonas sp.*, alcanzando un 100% de degradación de naftaleno, un hidrocarburo aromático. En el Manual de Bergey se menciona que una especie de este género es normalmente encontrada en el suelo, por lo que no es raro el hecho de que puedan sobrevivir especies de *Rhodococcus* en suelos contaminados por hidrocarburos. Por otro lado, el género *Streptomyces* ha sido reportado en suelos contaminados por hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) por Viñas (2005). De igual manera, la investigación realizada por Björklöf et al. (2009) menciona que se han logrado reportar especies de los géneros *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Mycobacterium* y *Nocardia* que fueron capaces de sobrevivir en suelos contaminados por hidrocarburos complejos envejecidos, especialmente en capas subterráneas y lo importante de este estudio es la realización de bibliotecas de clones basadas en el gen 16s rRNA donde obtuvieron como resultado que existen un gran número de géneros bacterianos y que algunos de estos han logrado sobrevivir en cantidades de oxígeno muy reducidas.

De forma complementaria, algo a resaltar de la investigación de López De Mesa et al. (2005) es la mención del género *Rhodococcus* como el género más explotado en bioprocesos no convencionales debido a su alta capacidad de transformar, degradar y utilizar como única fuente de carbono compuestos hidrófobos. También, se menciona que posee una gran variedad de vías metabólicas para degradación y modificación de compuestos aromáticos. Los resultados proporcionados por este estudio nos dan a entender que las especies de *Rhodococcus* pueden llegar a ser importantes para degradar compuestos que se encuentran en el petróleo.

La investigación realizada por Cando (2011), menciona que el género *Streptomyces* tiende a favorecer la degradación de fenoles, compuestos aromáticos, aromáticos clorados, lignocelulosas, también ha sido usado para biorremediación por metales pesados, degradación de pesticidas, herbicidas, plásticos y ácidos húmicos, debido a que producen enzimas como las lignocelulosas, quitinasas y hemicelulosas, además que tienen la característica de formar consorcios microbianos con bacterias, hongos y plantas. Además, las

características mencionadas por los autores concuerdan con las obtenidas por esta investigación. Se recomienda seguir con la investigación de las cepas enfocándose en evaluar su potencial en biorremediación o el estudio de metabolitos producidos, por ejemplo, con capacidad antagónica

Como menciona Aparicio et al. (2015) la biorremediación con actinobacterias podría ser una gran alternativa debido a su gran versatilidad metabólica además de que tienen la capacidad de crear consorcios y aumentar el potencial como biorremediadores y degradar metales pesados, hidrocarburos, herbicidas y pesticidas. Por lo que se recomienda realizar estudios y determinar si son capaces de degradar hidrocarburos y poder usarlas como biorremediadores de ambientes contaminados.

Al finalizar el análisis de los resultados y comparar con la información bibliográfica se encontraron similitudes con información publicada. Sin embargo, el uso de pruebas moleculares y la realización de más pruebas bioquímicas podrían ayudar en la confirmación del género y, posiblemente, la determinación de especie de estas cepas, en estudios posteriores. Anteriormente, las características fisiológicas se emplearon como única fuente de información taxonómica, aún con sus limitaciones y dificultades. Se llegó a proponer el uso de claves dicotómicas y poder clasificar y describir de forma más rápida las cepas de actinobacterias (Kuster, 1972). Sin embargo, con el advenimiento de nuevas tecnologías, en la actualidad se prefieren métodos fenotípicos, moleculares y proteómicos, ya que cada uno aporta con información de gran valor microbiológico, particularmente para el área clínica (Bou et al., 2011). Aquí, también entra en juego la rapidez, el costo y sensibilidad de cada método para ser usado debido a que los métodos moleculares y proteómicos emplean herramientas biotecnológicas, base de datos genómicos, instrumentación especializada, etc. que no siempre están el alcance de todos los laboratorios. Estas técnicas son usadas en proyectos donde se desea saber información acerca de genes, proteínas, enzimas, las cuales representan ciertas ventajas con los métodos tradicionales, pero a su vez tienen ciertas limitaciones e inconvenientes en su aplicación. Por ello, los criterios morfológicos y fisiológicos continúan siendo de suma utilidad, aún si se realiza la identificación molecular con secuenciación de amplicones o de genoma completo (Dhanasekaran y Jiang, 2016).

6. CONCLUSIONES

1. Se identificó siete aislados provenientes de una piscina de petróleo de la Amazonía ecuatoriana como bacterias pertenecientes al filo Actinomycetota. De acuerdo con las características evaluadas y su comparación con las descritas en el Manual de Bergey se considera que los géneros más probables de las cepas EC 2, 4 y 14 son *Streptomyces*, para EC 8 *Rhodococcus*, EC 7 y 16 pertenecen al género *Actinomyces* y EC 20 al género *Actinomadura*. Estos géneros concuerdan con los reportados en la literatura científica relativa a la diversidad bacteriana en suelos contaminados por hidrocarburos.
2. La información recopilada de publicaciones científicas relacionadas a bacterias del filo Actinomycetota presentes en suelos contaminados con hidrocarburos brindó un panorama de los géneros más frecuentemente asociados a estos ambientes. Al contrastarlos con los resultados obtenidos en este estudio, se obtuvo un primer acercamiento a la identificación de los microorganismos aislados de piscinas de petróleo de la Amazonia ecuatoriana, determinándose similitud en los hallazgos.
3. Se debe continuar con más estudios de estas cepas, tanto para la confirmación de su identificación, la determinación de especies, pero, sobre todo, de las aplicaciones biotecnológicas o como fuentes de principios bioactivos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Aparicio, J., Benimeli, C. S., y Polti, M. A. (2015). Biorremediación de Cr(VI) y lindano en suelos por actinobacterias: Selección de actinobacterias con mayor potencial para la biorremediación de suelos co-contaminados con Cr(VI) y lindano. Conicet. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/111586>
- Arbeli, Z. (2009). Biodegradation Of Persistent Organic Pollutants (POPs): I The Case Of Polychlorinated Biphenyls (PCB). *Acta Biológica*, 14(1), 57–88. <http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v14n1/v14n1a04>
- 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
- Björklöf, K., Karlsson, S., Frostegard, A. y Jørgensen, K. (2009). Presence of Actinobacterial and Fungal Communities in Clean and Petroleum Hydrocarbon Contaminated Subsurface Soil. *The open microbiology journal*. 3. 75-86. 10.2174/1874285800903010075.
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., y Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601–608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Cando, M. (2011). Determinación y análisis de un proceso de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos [Tesis de grado, Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/1520/11/UPS-CT002143.pdf>
- 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.

- 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>
- Chanqueo, L., y Morales, P. J. C. (2019). *Actinomyces radingae*. Revista Chilena De Infectología, 36(3), 369–370. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182019000300369>
- Chávez, Y. (2016). Dinámica de poblaciones bacterianas durante la descomposición de materia orgánica en suelo sometido a diferentes prácticas agrícolas. [Tesis de grado]. Centro de investigación y de estudios avanzados del instituto politécnico nacional unidad Zacatenco departamento de biotecnología y bioingeniería.
- De Pasquale, C., Palazzolo, E., Lo Piccolo, L., y Quatrini, P. (2012). Degradation of long-chain-alkanes in soil microcosms by two actinobacteria. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 47(3), 374–381. <https://doi.org/10.1080/10934529.2012.645786>
- Dhanasekaran, D., y Jiang, Y. (2016). Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications (2.a ed.). InTechOpen. <https://doi.org/10.5772/60457>
- García, L. (2011). Avances en la sistemática del género *Micromonospora*: estudio de cepas aisladas de la Rizosfera y Nódulos de *Pisum sativum*. <https://doi.org/10.14201/gredos.76406>
- González, Y. (2010). Los actinomicetos: una visión como promotores de crecimiento vegetal [Tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana]. <http://repository.javeriana.edu.co/bitstream/10554/8665/1/tesis618.pdf>
- 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>
- Guerra, G. M. G. (2014). Aislamiento y estudio de la diversidad de las poblaciones de Actinobacterias presentes en muestras de compost. <https://gredos.usal.es/jspui/bitstream/10366/125403/1/TFG%20Guillermo%20Pelaz%20AislamientoyEstudiodelaDiversidad.pdf>
- Hidrin, N, Goodfellow, M, Boiron, P, Moreno, M, y Serrano, J. A. (2001). Los estreptomicetes: Actualización y revisión didáctica. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 21(1), 36-38. Recuperado en 29 de mayo de

- 2023, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562001000100006&lng=es&tlng=es.
- Jiménez, D. (2011). Aislamiento y caracterización preliminar de genes de policétido sintasas tipo 1 en Actinomicetos aislados a partir de hormigas cortadoras de hojas *Atta cephalotes* [Trabajo de grado, Universidad Industrial de Santander]. Uis
- Jin Q y Kirk MF (2018) pH como control primario en microbiología ambiental: 1. Perspectiva termodinámica. Frente. Reinar. ciencia _ 6:21. doi: 10.3389/fenvs.2018.00021
- Kuster, 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>
- López De Mesa, J., Quintero, G., Guevara, A., Jaimes, D., Gutiérrez, S., y Garcia. (2005). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados de petróleo. NOVA, 4(5), 82–90. <https://www.redalyc.org/pdf/411/41140509.pdf>
- Micobacterias. Ryan K.J., y Ray C(Eds.), (2017). Sherris. Microbiología médica, 6e. McGraw Hill. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2169§ionid=162983157>
- Moreno, M., y Carmen, D. (2019). Estudio de microorganismos aislados de un suelo contaminado con desechos derivados de la explotación petrolera y de uno no intervenido. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/10596/1/236T0427.pdf>
- Muñoz-Peña, C., Ocaña-Cano, M. J., Amores-Antequera, C., y Cantudo-Muñoz, P. (2016). Infección cutánea por *Gordonia araii*. Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.02.006>
- Parada, R. B., Marguet, E. R., y Vallejo, M. (2017). Aislamiento y caracterización parcial de actinomicetos de suelos con actividad antimicrobiana contra bacterias multidrogo-resistentes. Revista Colombiana De Biotecnología, 19(2), 17–23. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.64098>
- 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

RGB to RAL Converter. (n.d.). <https://hextoral.com/rgb-to-ral/>

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

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

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&tlng=es.

Serrano, J., Díaz, C., y Uzcátegui, N. M. (2001). El género *Actinomadura*. Aspectos de su taxonomía, microbiología patología, clínica y terapéutica. Revista De La Sociedad Venezolana De Microbiología, 21(2), 34–37. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-332244>

<https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2007-2> Sun, S., Su, Y., Chen, S., Cui, W., Zhao, C., y Liu, Q. (2022). Bioremediation of oil-contaminated soil: Exploring the potential of endogenous hydrocarbon degrader *Enterobacter sp.* SAVR S-1. Applied Soil Ecology, 173, 104387. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104387>

UnADM. (2017, March 1). Unidad 3. Caracterización microbiana. Issuu. https://issuu.com/jazinaruizhernandez/docs/unidad_3_caracterizacion_microbiana#:~:text=El%20llevar%20a%20cabo%20la,pudiendo%20estas%20participar%20dentro%20de

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 en 11 de junio de 2023, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562009000200005&lng=es&tlng=es.
- Viñas, M. (2005). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica [Tesis doctoral, Universidad de Barcelona]. https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2396/TESIS_MVIN_AS_CANALS.pdf
- Whitman, W. B., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H., Trujillo, M. E., Ludwig, W., y Suzuki, K. (2012). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria. Springer.
- Wink, J. (2012). Methods for the taxonomic description of the Actinobacteria. University of Braunschweig. Recuperado de https://www.dsmz.de/microorganisms/wink_pdf/Actinomethods.pdf

Firma del (la) estudiante y fecha:



Kevin Alejandro Gallo Caisapanta

Quito, 30 de julio del 2023

Firma del director (a) de disertación y fecha:

Mtr. Verónica Luna

Quito, 30 de junio de 2023

Firma del coordinador (a) de la Escuela y fecha:

Mtr.Sonia Margarita Estrella Vásquez

Quito-----

Firma del decano (a) y fecha:

Mgtr. Diego Guevara

Quito-----

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

Medio agar 5315 (ISP3)

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

Medio agar 5265 (ISP2)

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

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

Medio agar 5323 (ISP5)

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

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	<u>Pesar sustancias en un</u>	<u>Pesar agar y colocar en el</u>
L-Tyrosine	0,5	<u>vaso de precipitación.</u>	<u>recipiente en el que se va a</u>
K ₂ HPO ₄	0,5	<u>Disolver los constituyentes</u>	<u>esterilizar. Preparar caldo y</u>
Fosfato dipotásico	0,5	<u>en 1L de H₂O. Ajuste el</u>	<u>adicionar al mismo</u>
Sulfato de magnesio.	0,5	<u>pH a 7,2 - 7,4. Estilizar en</u>	<u>recipiente. Estilizar en</u>
7H ₂ O		<u>autoclave.</u>	<u>autoclave.</u>
Cloruro sódico	0,5		
Agar	20,0		
Sulfato ferroso x 7H ₂ O	0,01		

11.2 COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Solución 5342 DSMZ.

Solución oligoelementos 2	
Sustancias	Cantidades g/l
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,64
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,11
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,15
$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	0,79

Solución 5314 DSMZ.

Solución elementos traza 3	
Sustancias	Cantidades g/l
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	3
Citrato férrico (Fe III)	1
MnSO_4	0,2
ZnCl_2	0,1
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
Tetraborato de sodio	0,2
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,004
Molibdato de sodio	0,01

Solución sales traza 4.

Solución de sales traza 4	
Sustancias	Cantidades g/l
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,1
$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	0,1
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,1

Solución salina

Solución salina	
Sustancias	Cantidades g/l
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1
$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	1
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1

ANEXO 2: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES SUPLEMENTARIAS**Solución stock de antifúngico (50 mg/L)**

Se disuelve 100 mg de cicloheximida (>98% de pureza) en 2 mL de dimetilsulfóxido. Esta mezcla se esteriliza mediante filtración por membrana de 0,22 μm (teflón o nylon); se recomienda usar una jeringa y filtro pequeños. Una vez filtrado se deberá guardar en refrigeración o congelación en tubos de polipropileno 1,5 o 2 mL, previamente esterilizados.

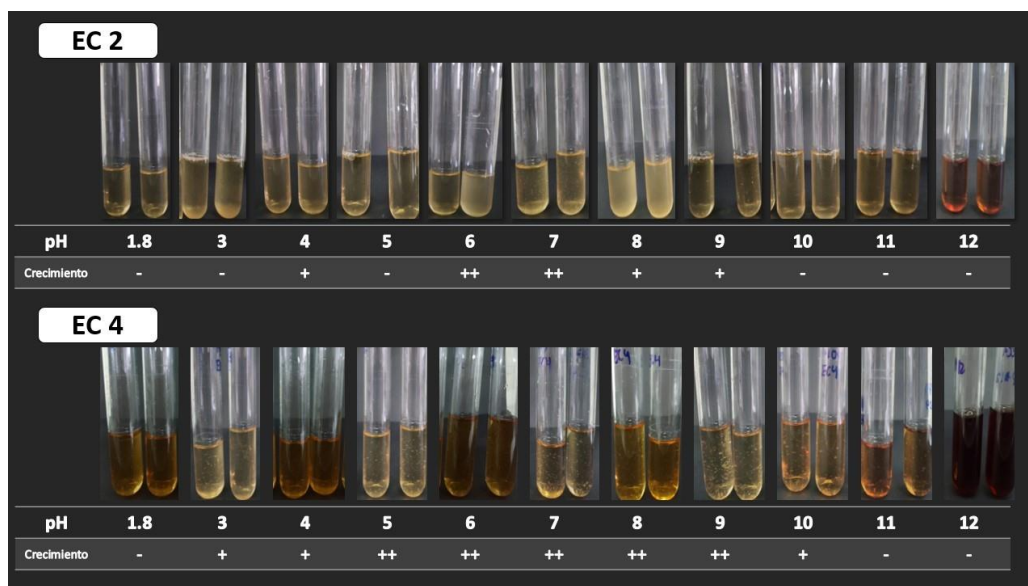
Para su adición al medio de cultivo se debe colocar 1 mL de la solución en 1L de medio (o su equivalente, dependiendo el volumen de medio preparado) en el momento previo al dispensado y agitar bien para asegurar una mezcla homogénea.

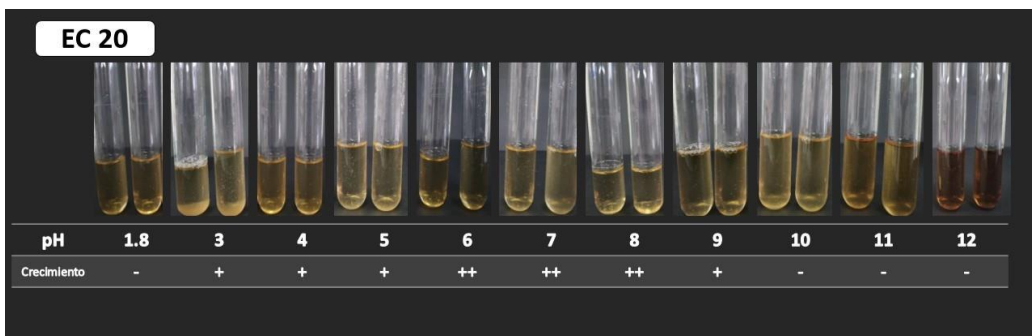
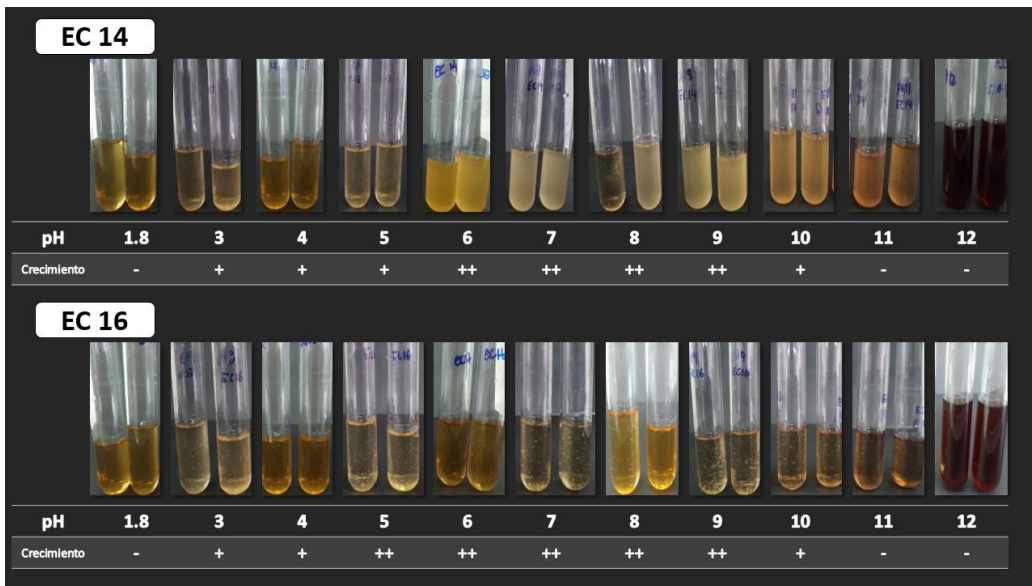
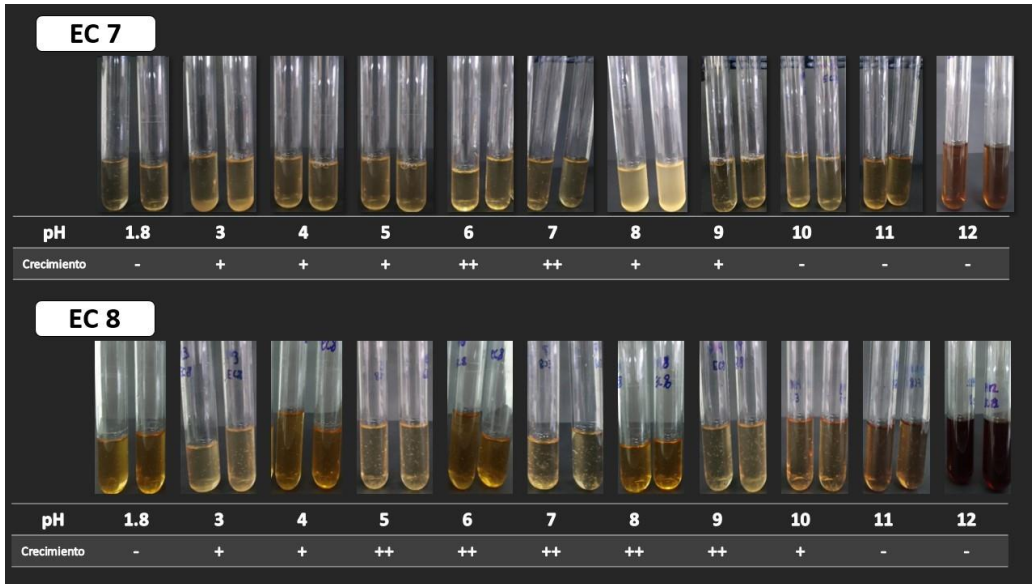
Solución stock de antibiótico (50 mg/L)

Disolver 100 mg de ácido nalidixico en 1 mL de NaOH 0,5M y, una vez disuelto, añadir 1 mL de agua destilada. Esta mezcla se esteriliza mediante filtración por membrana de 0,22 μm ; se recomienda usar una jeringa y filtro pequeños. Una vez filtrado se deberá guardar en refrigeración o congelación en tubos de polipropileno 1,5 o 2 mL, previamente esterilizados.

Para su adición al medio de cultivo se debe colocar 1 mL de la solución en 1L de medio (o su equivalente, dependiendo el volumen de medio preparado) en el momento previo al dispensado y agitar bien para asegurar una mezcla homogénea.

ANEXO 3. Fotos de resultados de ensayo de pH





ANEXO 4. Características importantes de géneros de actinobacterias considerados para la identificación taxonómica de las cepas estudiadas

Género	Forma de células	Forma de micelio	Características fisiológicas		%G/C	Formación de esporas	Tinción Gram	Apariencia de colonias		Respiración	Temperatura de crecimiento	Referencias bibliográficas
			Azúcares	Otros				Color	Textura			
<i>Rhodococcus</i>	Cocos o barrillas cortas	Ramificado	Metabolizan: maltosa, manosa, sorbitol, sacarosa	Catalasa positiva, ácido-alcohol resistente	67-73%	No esporulan	Grampositivas	Beige, crema, naranja, rojo, amarillo e incoloras	Ásperas, lisas o mucoides	Aerobio estricto	15-40°C	(Sánchez et al., 2004)
<i>Streptomyces</i>	Artrosporas aéreas	Micelio aéreo con cadenas de artrosporas Forman filamentos ramificados no fragmentados	Sacarosa, glucosa	Catalasa positiva, no son ácido-alcohol resistentes	66-78%	Cadenas cortas de esporas, esclerocios, picnidios, esporangios y sinnematos Esporas no móviles	Grampositivas	Blanco grisáceo, crema y negro	Inicialmente una superficie lisa, con micelio aéreo pueden parecer flocosa, granulosa, pulverulenta o aterciopelada	Aerobias	25-35°C Algunas especies crecen dentro del rango psicrófilo y termófilo	(Hidrin et al., 2001)
<i>Promicromonospora</i>	Hifas septadas ramificadas	Micelio que se fragmentan en formas no móviles, coccoides, en forma de Y o de V, bastoncillos, difteroides o clamidosporas	Glucosa, maltosa, sucrosa	Catalasa positiva, no son ácido-alcohol resistentes	70-75%	Clamidosporas	Grampositivas	Desde colores amarillos a blancos	De cóncavas, arrugadas, lisas y pastosas	Aerobias	28-30°C	(Chávez, 2016)
<i>Micromonospora</i>	Ramificadas y septadas	Ramificado	Fructosa, glucosa, sacarosa, celobiosa, galactosa, manosa, trehalosa, xilosa	No ácido resistente	68-75%	Esporas no móviles, sésiles o terminales en esporóforos cortos	Grampositivas	Amarillo pálido a naranja claro Dependiendo de la cepa, desarrollan una pigmentación azul verdosa, marrón, naranja	Lisas, mucosas	Aerobio a microaerófilico	20-40°C	(García, 2011)

									oscuro, púrpura o roja			
Burkholderia	Bacilos rectos	Forma de bastoncillos rectos	Lactosa, glucosa, celobiosa, sorbitol	Oxidasa y catalasa positivos	59-69%	No esporulan	Gramnegativas	Amarillas, purpuras, rojas Dependiendo en que medio se inocule	Lisas, convexas, mucoides	Aerobios	20-45°C	(Serret-López et al., 2020)
Kribella	Hifas vegetativas ramificadas	Forma de bastoncillos o cocos, no móviles	L-Arabinosa, D-Galactosa, D-Xylosa, Inositol y Manitol	No ácido resistente, catalasa positiva	67-71,3%	No esporulan	Grampositivas	Sin coloración distintiva. El micelio aéreo, si está presente, es principalmente blanco o amarillo pálido	Son de pastosas a blandas, a menudo con forma de líquen	Aerobios	28-30°C	(Arbeli, 2009)
Nocardia	Hifas de sustrato rudimentarias a muy ramificadas	Forma coccoidea a bastoncillos	D-Glucosa	Catalasa positiva, ácido-alcohol resistente	63-72%	No esporulan	Grampositivas a Gram-variables	Tonos de naranja, rosa, rojo o amarillo	Lisas o granulares e irregulares, arrugadas o apiladas	Aerobios	20-45°C	(De Pasquale et al., 2012)
Pseudonocardia	Hifas de sustrato ramificadas	Forma de varilla	Arabinosa, Glucosa, Ramnosa.	N/A	68-79%	Protación acropetal y/o por septación basipetal (fragmentación)	Grampositivas	El micelio del sustrato suele ser de color amarillento a marrón	Abultadas	Aerobios	15-37°C	(Jiménez, 2011)
Gordonia	Bastoncillos y cocos cortos no móviles	Forma de V o en cadenas cortas	Glicerol	Catalasa positiva	63-69%	No esporulan	Grampositivas a Gram-variables	El micelio del sustrato suele ser de color amarillento a marrón	Varía de convexo, brillante y liso a áspero, mate y plegado con márgenes irregulares	Aerobios	20-37°C	(Muñoz-Peña et al., 2016)

<i>Actinomyces</i>	Varillas rectas o ligeramente curvadas	Ramificado y filamentosos	Glucosa y fructosa	No acidorresistente	55-71%	No esporulan	Grampositivas a Gram-variables	Color blanco a blanco grisáceo o blanco cremoso La coloración depende del medio de cultivo	De áspera y seca a desmenuzable o lisa Blanda a mucoide	Facultativamente anaerobias, algunas crecen bien aeróbicamente	35-37°C	(Chanqueo & Morales, 2019)
<i>Zhihengliuella</i>	Bastoncillos cortos	Forma de bastoncillos	Maltosa, glucosa, sacarosa l-arabinosa y trehalosa	Catalasa positiva y oxidasa negativa	66,5-70.3%	No esporulan	Grampositivas	Amarillo pálido o blanco	Opacas, circulares y lisas	Aerobios	27-29°C	(Castro, 2019)
<i>Mycobacterium</i>	Bastoncillos ligeramente curvados o rectos	Ramificado	Glicerol	Ácido-alcohol resistentes	57-73%	No esporulan	Difíciles de teñir por este método, pero se consideran Grampositivas	Color blanco a crema; algunas de amarillo o naranja	Lisas, rugosas	Aerobios a microaerófilos	20-45°C	(Mycobacterias, 2017)
<i>Amycolatopsis</i>	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 positivos	Color azul y un pigmento difusible marrón claro	Lisas	Aerobios a anaerobios facultativos	20-45°C Algunos mayores a 45°C	(Guerra, 2014)
<i>Actinomadura</i>	Cadenas de bastoncillos irregular	Extensamente ramificado, no fragmentado	Manitol, Rhamnose, Glucose, Arabinose	N/A	66-73%	Esporas individuales, cadenas rizadas en espiral o rectas	Gram positivos	Azul, marrón, crema, gris, verde, rosa, rojo, blanco o amarillo	Irregular, rugosa, lisa, espinosa o verrugosa	Aerobios	25-40°C	(Serrano et al., 2001)