

**Aislamiento y caracterización morfológica de
cepas nativas de actinomicetos y su actividad
antagónica contra *Ralstonia solanacearum*,
Escherichia coli, *Staphylococcus aureus* y
Salmonella sp.**

Bryan Leonardo Guevara Larrea

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2017

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA EN AMBIENTE Y DESARROLLO

**Aislamiento y caracterización morfológica de
cepas nativas de actinomicetos y su actividad
antagónica contra *Ralstonia solanacearum*,
Escherichia coli, *Staphylococcus aureus* y
*Salmonella sp.***

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero en Ambiente y Desarrollo en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Bryan Leonardo Guevara Larrea

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2017

Aislamiento y caracterización morfológica de cepas nativas de actinomicetos y su actividad antagónica contra *Ralstonia solanacearum*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* sp.

Bryan Leonardo Guevara Larrea

Resumen. Dentro de la gran variedad de bacterias habitantes del suelo se encuentran los actinomicetos, los cuales han sido estudiados ampliamente debido a su potencial antimicrobiano de interés médico y comercial. El objetivo del estudio fue aislar, purificar y detallar las características de la morfología colonial, celular e identificar los posibles géneros de cepas de actinomicetos obtenidas a partir de muestras de suelo procedentes de cuatro sitios diferentes en la Reserva Biológica Uyuca (RBU), ubicada en el departamento de Francisco Morazán, Honduras. Además, se evaluó la actividad antagónica de las cepas aisladas contra cuatro bacterias patógenas: *Ralstonia solanacearum*; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* sp. Un total de 12 cepas fueron aisladas y sometidas a pruebas bioquímicas como tinción de gram, oxidasa, catalasa, y a comparación morfológica usando el manual de Bergey, con lo cual se identificaron ocho cepas de posible género *Nocardia*, dos de *Streptomyces* y dos de *Terrabacter*. Se determinó que cinco cepas tuvieron propiedades inhibitorias contra *Staphylococcus aureus*, dos cepas contra *Ralstonia solanacearum*, una cepa contra *Escherichia coli* y una contra *Salmonella* sp. Se estableció un cepario por medio de la inoculación de las cepas en suelo estéril y en agar avena inclinado. El suelo de la RBU contiene bacterias de la clase Actinobacteria con potencial antagónico contra estas cuatro bacterias patógenas.

Palabras clave: Actinobacteria, antibiótico, bioprospección, fitopatógeno, patógeno humano.

Abstract. Among the great variety of soil-bacteria are actinomycetes, which have been extensively studied because of their antimicrobial potential of medical and commercial interest. The objective of this study was to isolate, purify and describe the characteristics of colonial and cellular morphology and to identify the possible genera of actinomycetes strains obtained from soil samples from four different sites in the Uyuca Biological Reserve (RBU) located in the department of Francisco Morazán, Honduras. A total of 12 strains were isolated and subjected to biochemical tests such as Gram staining, oxidase, catalase, and morphological comparison using the Bergey manual, which identified eight strains of possible genus *Nocardia*, two of *Streptomyces* and two of *Terrabacter*. The antagonistic activity of each strain was evaluated against four pathogenic bacteria: *Ralstonia solanacearum*; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* sp. Five strains were found to have inhibitory properties against *Staphylococcus aureus*, two strains against *Ralstonia solanacearum*, one strain against *Escherichia coli* and one strain against *Salmonella* sp. A collection was established by inoculation of the strains on sterile soil and inclined oat agar. It was concluded that the soil of the RBU contains bacteria of the class Actinobacteria with potential inhibitory characteristics against these four pathogenic bacteria.

Key words: Actinobacteria, antibiotic, bioprospecting, human pathogen, phytopathogen.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. METODOLOGÍA	4
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
4. CONCLUSIONES	24
5. RECOMENDACIONES	25
6. LITERATURA CITADA.....	26
7. ANEXOS	29

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Nomenclatura de muestras de suelo	5
2. Características morfológicas de cepas de actinomicetos aisladas y purificadas	10
3. Características macro y microscópicas de actinomicetos y posible género	16
4. Pruebas de antagonismo de cepas aisladas contra bacterias patógenas (cm) ...	21
Figuras	Página
1. Mapa de área total de la Reserva Biológica Uyuca (RBU), tipos de cobertura y sitios muestreados.....	4
2. Procedimiento de inoculación de muestras en el medio de crecimiento	6
3. Procedimiento de purificación de colonias típicas de actinomicetos	7
4. Prueba de antagonismo con cepa de actinomiceto y bacterias patógenas	8
5. Preservación de cepas de actinomicetos mediante cultivo seriado en frascos	9
6. Prueba de catalasa en cepa de actinomiceto BM-A con resultado positivo observada bajo estereoscopio	14
7. Prueba de oxidasa en cepas BPD-I y BPD-K con resultado negativo, reacción incolora	14
8. Actividad antagónica de cepa BPD-J de posible género <i>Streptomyces</i> contra <i>Ralstonia solanacearum</i>	19
9. Actividad antagónica de cepa BM-B de posible género <i>Nocardia</i> contra <i>Escherichia coli</i>	19
10. Actividad antagónica de cepa RPV-F de posible género <i>Terrabacter</i> contra <i>Staphylococcus aureus</i>	20
11. Actividad antagónica de cepa BPD-I de posible género <i>Nocardia</i> contra <i>Staphylococcus aureus</i>	21
12. Cepario en frascos con AAV guardados en la incubadora	22
13. Frascos de preservación de cepas de actinomicetos en suelo estéril	22
14. Portada del atlas de actinomicetos.....	23
Anexos	Página
1. Medio Agar Avena (AAV).....	29
2. Fotografías de cepas iniciales de actinomicetos.....	29

1. INTRODUCCIÓN

Dentro de la gran variedad de bacterias habitantes del suelo se encuentran los actinomicetos; bacterias gram-positivas que muestran un crecimiento filamentosos como los hongos. Son aeróbicos, heterótrofos, y ampliamente extendidos en la naturaleza. Pertenecen al filum Actinobacteria, clase Actinobacteria, subclase Actinobacteridae, orden Actinomycetales que incluye 10 subórdenes, de donde se conocen más de 30 familias y cerca de 160 géneros (Chavan, Mulaje, & Mohalkar, 2013).

El hábitat de los actinomicetos es variado, desde ambientes terrestres, de agua dulce y salada. El suelo es el hábitat más importante y estudiado de las actinobacterias con los estreptomicetos como principal componente de su población. Este género ha sido el más estudiado y aislado, dado que las actinobacterias terrestres, presentan un potencial antimicrobiano de interés médico y comercial (Anandan, Dharumadurai, & Ponnusamy, 2016).

Los actinomicetos pueden desarrollarse en ambientes con pH ácidos y alcalinos, así como a diferentes concentraciones de sal. Es posible encontrar géneros de actinomicetos adaptados a aguas marinas y dulces, como lagos y ríos, donde actualmente hay una emergente oportunidad para bioprospección de estos microorganismos (Anandan et al., 2016).

La diversidad de actinobacterias se fundamenta en la capacidad de desarrollarse en varios hábitats y al rol que cumplen en cada uno de los ecosistemas. Existen actinobacterias mesófilas y termófilas que pueden sobrevivir hasta una temperatura de 60 °C. Sin embargo, la temperatura óptima para su crecimiento y reproducción es de 20 °C a 42 °C. También, existen actinobacterias acidófilas, tolerantes a pH bajo, especialmente en suelos con poco drenaje con un rango de sobrevivencia de hasta 3.5 pH, sin embargo, su rango óptimo es cerca de 5.5 (Anandan et al., 2016).

Las actinobacterias halófilas pueden encontrarse en aguas marinas o sustratos con altas concentraciones de sal de hasta 100 g/L Existen otros tipos de actinobacterias, que se clasifican como endófitas, que en su mayoría no producen cambios visibles en sus hospederos- Actinobacterias simbióticas, endosimbióticas e incluso se pueden encontrar estos microorganismos dentro de animales como en el intestino de aves, cumpliendo el rol de probiontes (Latha, Vinothini, Calvin, & Dhanasekaran, 2016).

La identificación de los actinomicetos puede llevarse a cabo mediante diversas formas (identificación morfológica macroscópica, microscópica e identificación molecular) considerando una variedad de características (Sharma, Dangi, & Choudhary, 2014). La identificación morfológica se realiza teniendo en cuenta características macroscópicas de la

colonia considerando textura polvosa, color, forma, superficie y borde (Salazar Loaiza et al., 2014). Para la identificación microscópica se tienen en cuenta características observadas mediante tinción de Gram, como micelio aéreo y vegetativo, fragmentación del micelio en diversas formas, agrupación de esporas, presencia de espirales en pares o grupos en el micelio, así como la producción de pigmentos y se toman en consideración las características descritas en el Manual de Determinación Bacteriológica de Bergey (Bergey, Buchanan, & Gibbons, 1974).

En la identificación por medio de métodos moleculares se usan técnicas de amplificación de ADN y secuenciación. Dicha identificación es más específica en comparación con los métodos morfológicos o de requerimientos de crecimiento. La secuencia que se amplifica es la 16S ADNr, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) posteriormente la secuencia obtenida es analizada por medio de softwares que permiten construir árboles filogenéticos, de identificación de cepas (Chen, Jiang, Li, Han, & Jiang, 2016).

La importancia de los actinomicetos se debe a que han sido bien conocidos por la producción de metabolitos secundarios que son beneficiosos y se usan en diferentes industrias. Muchos de los antibióticos utilizados actualmente como la estreptomina, gentamicina, rifampicina y la eritromicina son productos de estos microorganismos (Evangalista Martínez & Moreno Enríquez, 2007).

El uso de estos metabolitos no sólo radica en la industria farmacéutica, sino también en la agricultura. Estudios previos mostraron que los actinomicetos aislados de suelo en Malasia tienen el potencial de inhibir el crecimiento de varios patógenos en cultivos como la papa, que son afectados por bacterias como *Xanthomonas campestris* o *Ralstonia solanacearum* (Lim, Seng, & Abd, 2007).

Tomando en consideración el gran impacto de los actinomicetos en el suelo al poseer diversas capacidades como degradar materia orgánica y su uso potencial como agentes de control biológico contra bacterias fitopatógenas. Dada estas características, surge el interés de realizar el aislamiento y la caracterización morfológica de actinomicetos del suelo de la Reserva Biológica Uyuca (RBU) y determinar su potencial antagonico contra la bacteria fitopatógena *Ralstonia solanacearum* que afecta cultivos de tomate, chile, entre otros (Melgar, Rivera, Brown, & Weller, 2012). Así mismo la actividad antagonica contra *Escherichia coli*, bacteria que causa brotes de diarrea, síndrome urémico hemolítico, colitis hemorrágica y cuadros de disentería, principalmente en niños (Rodriguez, 2002). También contra *Staphylococcus aureus* que puede causar múltiples problemas de salud, que van desde infecciones de piel, hasta enfermedades que amenazan la vida en humanos y animales (Cervantes, García, & Salazar, 2014) y *Salmonella* sp., que provoca salmonelosis, una de las infecciones transmitida por alimentos más frecuentes en todo el mundo (Betancor & Yim, 2012).

En años anteriores, se han realizado diversos estudios en la RBU, con respecto a la diversidad de mamíferos, aves e insectos. Sin embargo, al ser un área con distintos tipos de suelos a diferentes alturas y tipos de cobertura boscosa, convierten a esta reserva en un área de interés para el análisis de actinomicetos en el suelo, y así poder identificar si poseen potencial antagonico contra bacterias patógenas.

La importancia del presente estudio radica en la necesidad de explorar nuestros propios recursos en búsqueda de potenciales fuentes de microorganismos que puedan ser útiles o que nos provean sustancias de interés, para su uso en control biológico de plagas y enfermedades de cultivos, así como de control en patógenos que afectan animales y humanos.

Los objetivos del estudio fueron:

- Obtener colonias de actinomicetos a partir de muestras de suelo procedentes de cuatro zonas distintas de la RBU.
- Determinar mediante las características de la morfología colonial celular y pruebas bioquímicas la posible identidad de los actinomicetos aislados.
- Evaluar la actividad antagónica de las cepas de actinomicetos aisladas y caracterizadas contra *Ralstonia solanacearum*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* sp.
- Generar un atlas con toda la información referente a morfología colonial, celular y pruebas bioquímicas de las cepas.

2. METODOLOGÍA

Sitio de estudio.

La recolección de muestras de suelo para el aislamiento de actinobacterias se llevó a cabo en la RBU ubicada a 20 km de la Escuela Agrícola Panamericana (EAP), Zamorano (Figura 1). El aislamiento de las actinobacterias su caracterización morfológica y pruebas de antagonismo se realizaron en el laboratorio de Microbiología Ambiental de la Carrera de Ingeniería en Ambiente y Desarrollo (IAD) de la EAP, Zamorano.

Sitios de muestreo.

Se tomaron las muestras en cuatro sitios con cobertura vegetal distinta, basados en los datos del plan de manejo de la RBU. Los sitios de muestreo corresponden a bosque latifoliado (BL), bosque de pino denso (BPD), bosque mixto (BM) y área de rocas con poca vegetación (RPV) (Figura 1).

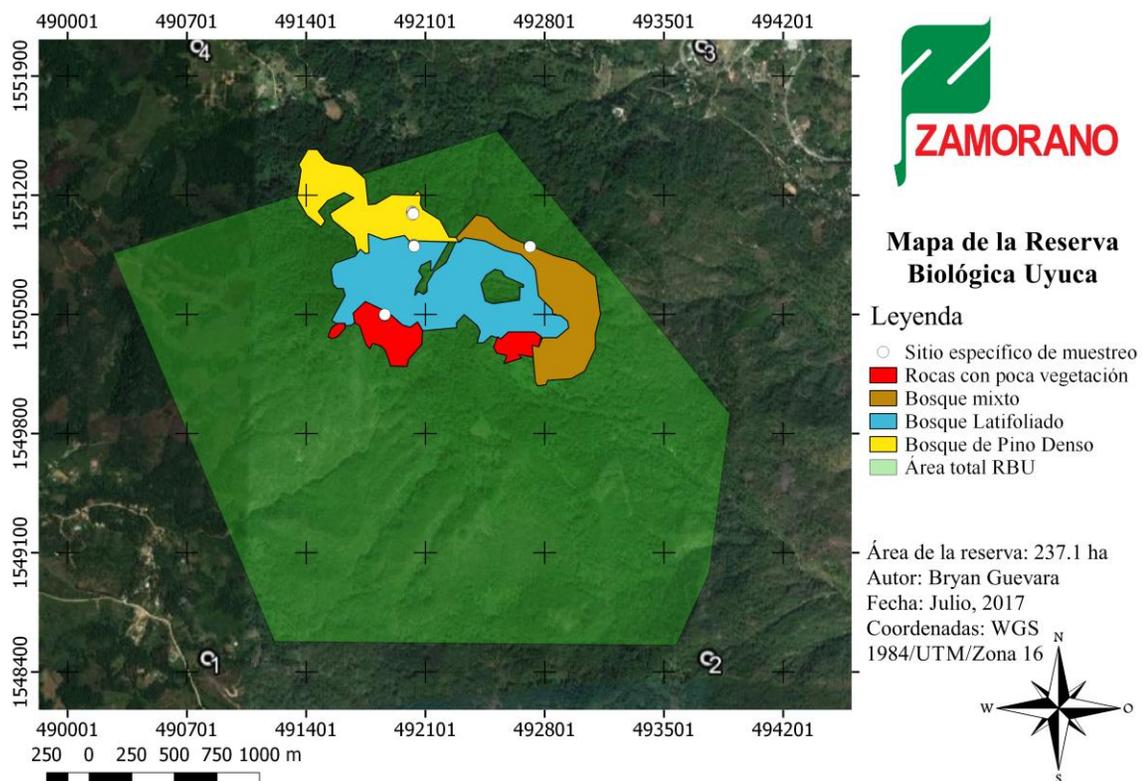


Figura 1. Mapa de área total de la Reserva Biológica Uyuca (RBU), tipos de cobertura y sitios muestreados.

Recolección de muestras de suelo.

Se recolectaron cinco muestras de aproximadamente 100 gramos de suelo en cada uno de los cuatro diferentes sitios de cobertura en la RBU. Todas las muestras se tomaron a 20 cm de profundidad y para ello se utilizó un barreno el cual se desinfectó entre cada muestra para evitar contaminación cruzada. El muestro fue sistemático, la distancia aproximada entre uno y otro punto de muestreo en los diferentes sitios de cobertura fue de cinco metros en zigzag. Las muestras se guardaron en bolsas de polietileno y se transportaron al laboratorio de Microbiología Ambiental en una caja de cartón. Las muestras fueron numeradas de manera consecutiva siguiendo el formato que se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Nomenclatura de muestras de suelo

Lugar de procedencia	Nomenclatura	Número de muestra
Bosque Mixto	BM	1 - 5
Bosque Latifoliado	BL	6 - 10
Rocas con poca vegetación	RPV	11 - 15
Bosque de Pino Denso	BPD	15 - 20

Preparación de muestras de suelo.

De cada muestra, se pesó 15 gramos de suelo y se eliminaron los grumos haciendo uso de un mortero y pistilo, posteriormente se colocaron en placas Petri de vidrio donde se secaron a temperatura ambiente (24 °C) durante cinco días.

Inoculación de muestra en medio de cultivo.

A partir de las muestras se tomaron 10 gramos de suelo que fueron diluidos en 90 mL de Agua Peptonada al 0.1% (AP-0.1%) y posteriormente se realizaron diluciones consecutivas 1:10 (10^{-1} a 10^{-5}), de las últimas dos diluciones (10^{-4} y 10^{-5}) se inocularon 50 μ L por duplicado en placas de medio de cultivo agar avena (AAV) (Figura 2). Una vez inoculadas las placas se procedió a esparcir el inóculo con un asa de siembra en L para obtener una dispersión homogénea por toda la superficie del medio. Las placas fueron selladas con papel Parafilm® y se colocaron en una caja de cartón sellada con papel aluminio para evitar la entrada de luz, a temperatura ambiente (24 °C) por un período de siete días.

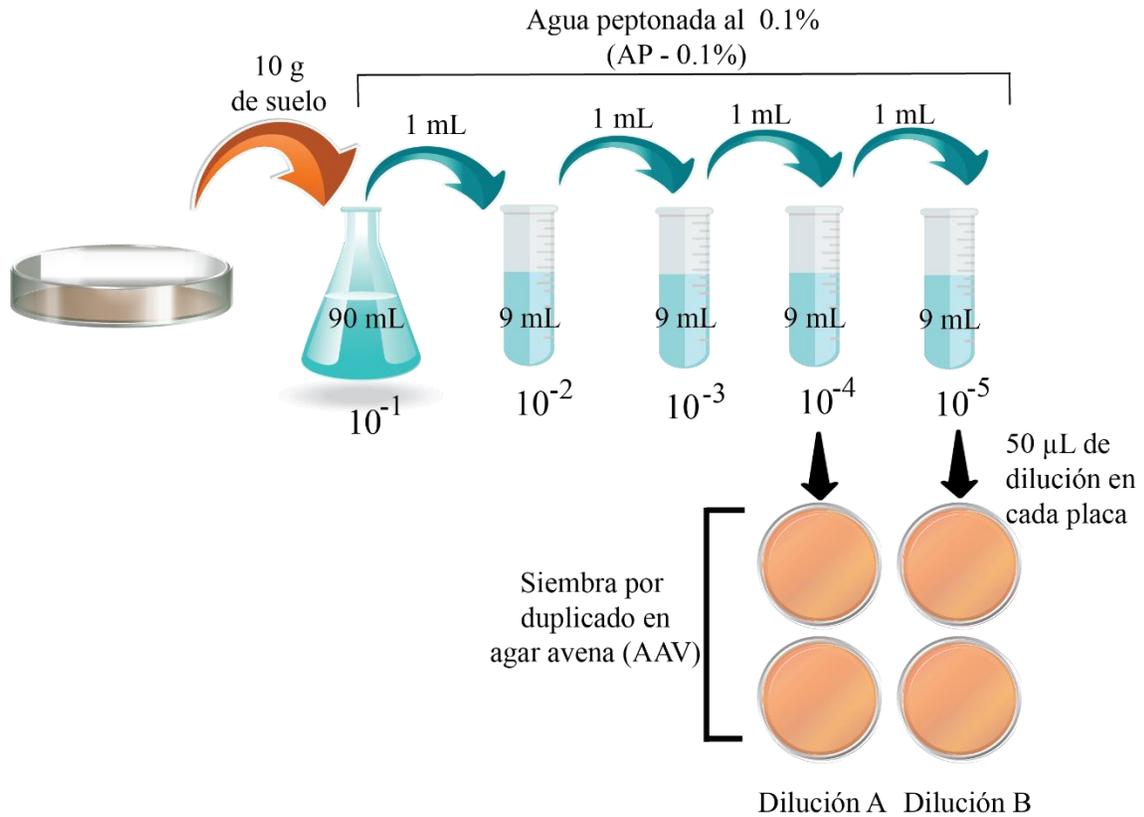


Figura 2. Procedimiento de inoculación de muestras en el medio de crecimiento.

Se procedió a monitorear las placas inoculadas cada 24 horas, para identificar si existe crecimiento de colonias bacterianas con características morfológicas relacionadas a la clase Actinobacteria. Las cuales se caracterizan por presentar colonias de apariencia polvosa adheridas firmemente a la superficie del agar, a su vez producen hifas y conidios o esporas en diversos medios de cultivo (Bergey & Holt, 2000). Una vez obtenidas las colonias típicas se procedió a su purificación.

Purificación de colonias típicas de actinomicetos.

A los siete días posteriores a la inoculación de las muestras en AAV, se procedió a identificar las colonias que presentaron morfología colonial típica de actinomicetos como textura polvosa. Cada colonia fue retirada de la placa con un asa de siembra en punta circular, y se realizó una suspensión en 200 µl de AP-0.1%, la cual se homogenizó en el vortex y luego se inoculó nuevamente en placas de medio AAV (Figura 3). Todas las placas se guardaron en la incubadora por siete días a 28 °C. Se observó y documentó por medio de fotografías tomadas con estereoscopio y el software MoticCam® si las cepas produjeron pigmentos de distintos colores en el medio de cultivo y hubo presencia de secreciones de geosmina.

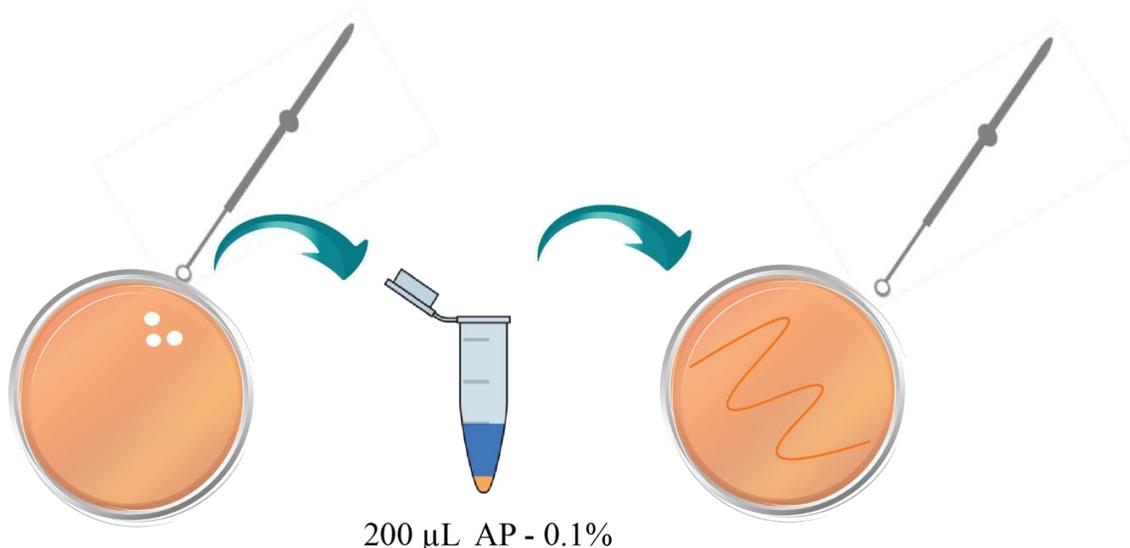


Figura 3. Procedimiento de purificación de colonias típicas de actinomicetos.

Prueba de tinción de gram.

A partir de los aislamientos purificados se realizó un frotis con cada cepa en un porta objetos, posteriormente se cubrió el frotis con cristal violeta durante un minuto. Luego se lavó con agua destilada para eliminar exceso de colorante, para luego cubrir nuevamente con lugol durante un minuto. Posteriormente, se lavó y se colocó alcohol-acetona por cinco segundos para nuevamente volver a lavar, finalmente se cubrió el frotis con safranina durante un minuto como colorante de contraste. Las bacterias Gram positivas se teñirán de color violeta intenso, y las negativas de color rosado (Aquihuatl Ramos & Pérez, 2004). Cada prueba fue observada bajo el microscopio a 100X y fotografiada.

Prueba bioquímica de catalasa.

Se colocó una gota de peróxido de hidrógeno al 3% sobre un porta objetos y luego con un palillo de madera se mezcló cada una de las colonias purificadas. Las colonias tenían 48 horas de inoculadas en placas de AAV. El resultado es positivo cuando se da una formación inmediata de burbujas visibles (O_2), caso contrario es negativa (Fernández, García, Saéz, & Valdezate, 2010).

Prueba bioquímica de oxidasa.

Sobre pedazo de papel filtro estéril se vertió una gota de reactivo de oxidasa Carolina[®] (dimetil p-fenilendiamina), luego se colocó con un palillo de madera, una colonia de actinomiceto de cada una de las placas de AAV. El resultado es positivo cuando hay cambio de color rojo-fucsia en la tira de papel impregnada con el reactivo de oxidasa, si se mantiene incolora, es negativo (Fernández et al., 2010).

Identificación de posible género de actinomicetos.

Se utilizaron las fotografías tomadas de tinción de Gram de cada cepa y se comparó la morfología observada con las ilustraciones que muestra el manual de microbiología de Bergey, que agrupa en un diagrama esquemático el crecimiento del micelio aéreo característico de cada uno de los géneros de actinomicetos (Bergey & Holt, 2000).

Pruebas de antagonismo con el método de estría en placa.

Se resembró cada cepa de actinomiceto en placas de AAV de forma estriada en el centro de la placa. Las cepas se incubaron a 28 °C por siete días. Luego de este tiempo, se inocularon cuatro bacterias patógenas: *Ralstonia solanacearum* obtenidas del laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* sp, proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano. Todas las bacterias fueron inoculadas en caldos nutritivos para luego proceder a la inoculación en las placas de AAV junto a cada cepa de actinomiceto (Figura 4).

Las bacterias patógenas se sembraron con asa de siembra de punta circular, la cual se introdujo en el caldo nutritivo, y luego se esparció sobre la superficie de la placa. Se sembró desde el borde de la placa hacia el borde de la colonia de actinomicetos, en línea recta con una longitud de 2.5 centímetros. Las placas de las pruebas de antagonismo se incubaron a 28 °C por 48 horas.

El efecto inhibidor se determinó por la capacidad de las bacterias patógenas de crecer cerca de las cepas de actinomicetos. Se usaron cuatro placas control con medio de cultivo AAV en donde se sembró cada bacteria patógena para asegurar su crecimiento sin la presencia de actinomicetos. Se midió la zona de inhibición desde el borde de la colonia de la cepa patógena hasta el borde del actinomiceto. Se considera una inhibición total si no se desarrolló la cepa patógena en los 2.5 centímetros de estriado, y una inhibición parcial, por debajo de esta longitud medida.

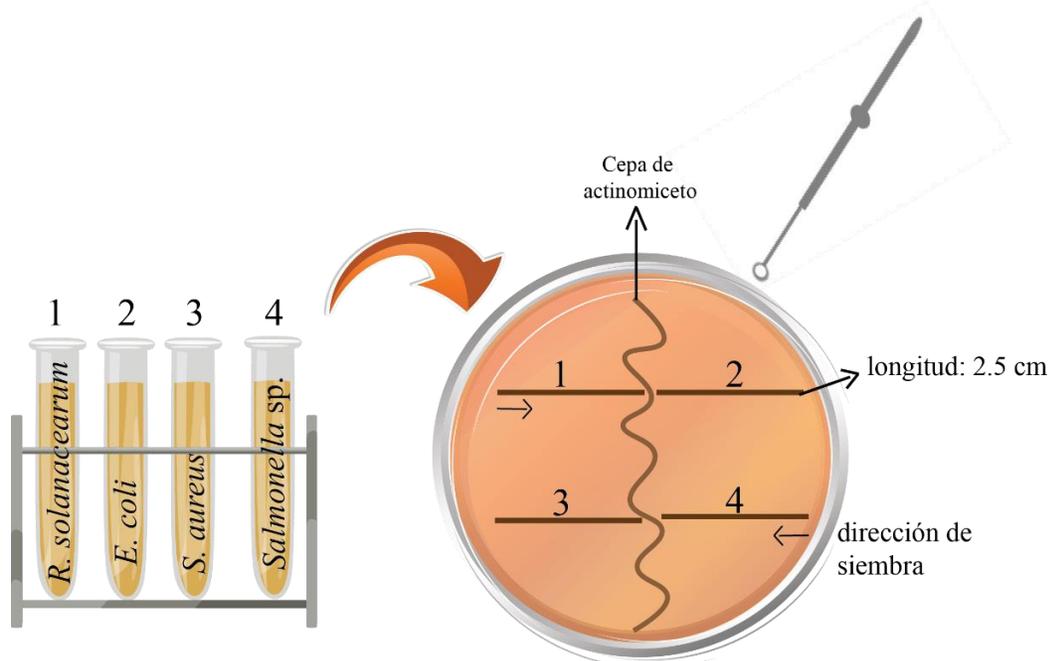


Figura 4. Prueba de antagonismo con cepa de actinomiceto y bacterias patógenas.

Preservación mediante cultivo seriado.

Se resembraron las cepas de forma estriada desde las placas a frascos pequeños estériles con medio AAV. El medio fue vertido de forma inclinada para evitar la desecación, la tapa no se cerró completamente para facilitar aireación y se guardaron en la incubadora a 28 °C (Figura 5) (Ángel Alarcón, 2006).

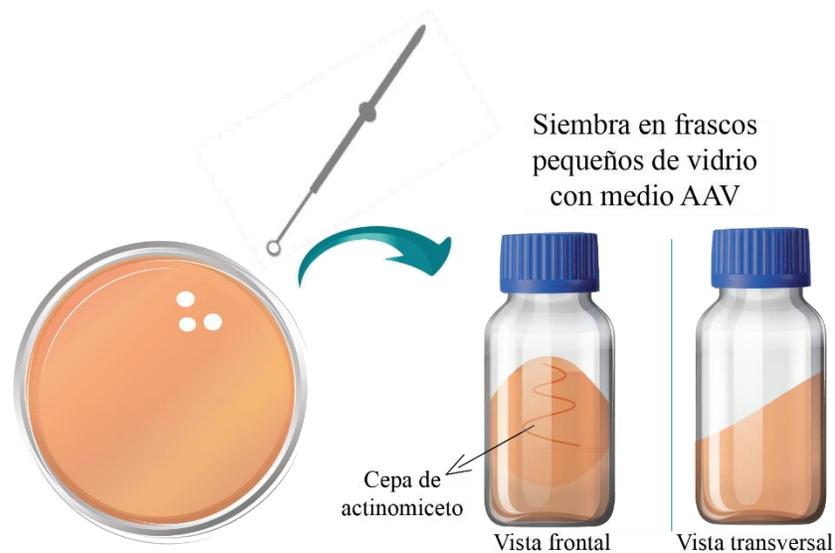


Figura 5. Preservación de cepas de actinomicetos mediante cultivo seriado en frascos.

Preservación en suelo estéril.

Se esterilizó y secó 30 gramos de suelo proveniente de las muestras originales para preservar cada cepa. Se realizó suspensión en 3 mL de agua peptonada al 0.1% en tubos falcon, se homogenizó la suspensión colocándolo en el vortex y luego se vertió en el suelo para que sea absorbido. Se almacenó a temperatura ambiente (25 °C) en el laboratorio de Microbiología Ambiental (Ángel Alarcón, 2006).

Elaboración de atlas de actinomicetos.

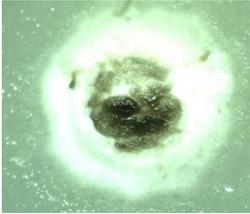
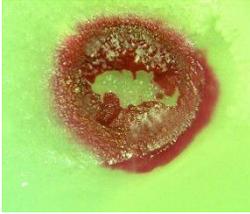
Se diseñó un atlas impreso en físico en el programa Adobe Illustrator®, donde constan las fotografías de cada cepa con su respectiva información desde sitio de origen, resultados de las pruebas bioquímicas, características de morfología celular, características de morfología colonial y resultados de las pruebas de antagonismo contra las cuatro bacterias patógenas.

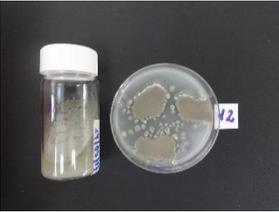
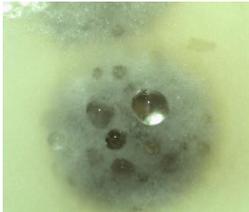
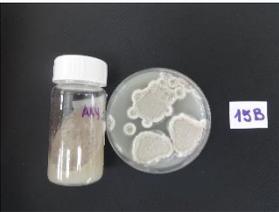
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cepas aisladas de muestras de suelo de la RBU.

Se aislaron 12 cepas de actinomicetos de la RBU cuyas características de morfología colonial se detallan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Características morfológicas de cepas de actinomicetos aisladas y purificadas

Sitio de muestreo	Cepa	Aislado inicial	Aislado purificado	Características macroscópicas
Bosque mixto	BM-A			Textura de la colonia: Polvosa Color: Gris oscuro, borde gris Presencia de pequeñas secreciones transparentes de geosmina
	BM-B			Textura de la colonia: Polvosa Color: Gris oscuro en el centro y borde blanco
Bosque latifoliado	BL-C			Textura de la colonia: Rugosa Color: Rojo claro en el centro y borde rojo intenso.

Sitio de muestreo	Cepa	Aislado inicial	Aislado purificado	Características macroscópicas
Rocas con poca vegetación	RPV-D			Textura de la colonia: Polvosa Color: Blanco Producción de geosmina
	RPV-E			Textura de la colonia: seca y polvosa Color: Gris verdoso con borde blanco.
	RPV-F			Textura de la colonia: Polvosa Color: Centro gris, y borde translúcido y fragmentado
	RPV-G			Textura de la colonia: Algodonosa Color: Gris y borde blanco Producción de geosmina
Bosque de pino denso	BPD-H			Colonia transparente, con expansión colonial en todo el medio
	BPD-I			Textura de la colonia: Polvosa Color: Blanca con halo del mismo color Pigmentación amarilla en todo el medio de crecimiento

Sitio de muestreo	Cepa	Aislado inicial	Aislado purificado	Características macroscópicas
	BPD-J			Textura de la colonia: Polvosa Color: Negro Presenta pigmentación de color café en medio de cultivo
Bosque de pino denso	BPD-K			Textura de la colonia: Polvosa Producción de pigmento color café en todo el medio de cultivo
	BPD-L			Textura de la colonia: Polvosa Color: Gris Producción de secreciones transparentes de geosmina

Se aislaron cinco cepas del BPD y cuatro la zona de RPV, las cuáles poseen características de mayor retención de humedad en el suelo, debido a la cantidad de materia orgánica en BPD y a la poca exposición del suelo en RPV que evita altas tasas evaporación. En cambio, en BL y BM se aislaron una y dos cepas respectivamente, esto podría deberse a que varios parches de estas coberturas boscosas se encuentran en regeneración, con menor cantidad de materia orgánica en descomposición que en bosques con mayor cobertura vegetal. BL y BM pueden llegar a tener una temperatura de entre 12° a 18 °C, lo cual puede tener un efecto en el desarrollo de los microorganismos (Mora, López, Acosta, & Maradiaga, 2013). Como se informa en otro estudio realizado en China, donde se han aislado más cepas de actinomicetos de bosques lluviosos y con mayor humedad en el suelo que en bosques fríos, con bajas temperaturas (Jiang, Li, Chen, & Jiang, 2011).

Según el plan de manejo de la RBU, todos los sitios pertenecen a la clasificación de bosque muy húmedo montano bajo subtropical (bmh – MBS) (Mora et al., 2013) la cual posee suelos con alto contenido de hojarasca, son poco profundos, ácidos por su contenido de agua y lenta descomposición de material vegetal dadas sus bajas temperaturas de entre 12° a 18 °C (Romero, 2009). Estas características benefician al desarrollo de actinomicetos, por la presencia de humedad y materia orgánica (Jiang et al., 2011).

Purificación en agar avena.

Se observó un óptimo desarrollo de las 12 cepas de actinomicetos en medio de cultivo AAV. Este medio es recomendado para el cultivo de hongos, ya que es una buena fuente de nitrógeno, carbono, proteínas y nutrientes necesarios para su desarrollo (HiMEDIA laboratories, 2011). Los actinomicetos poseen características semejantes a los hongos, por lo que sus requerimientos nutricionales para desarrollarse y reproducirse son muy similares. El medio AAV está compuesto por agar bacteriológico y hojuelas de maíz los cuales son ingredientes fáciles de conseguir y de bajo costo, además su preparación es sencilla.

Producción de pigmentos

De las 12 cepas aisladas, se destacan las cepas BL-C por producir pigmentación de color rojo intenso en el medio de cultivo, BPD-I la cual produjo pigmento color amarillo, BPD-J y BPD-K, en las que se observó pigmentación de color café opaco y café claro, respectivamente. Los actinomicetos también han presentado producción pigmentos carotenoides y enzimas extracelulares que son producto de metabolismo de diversos compuestos del medio en el que se desarrollan (Bonifaz, 2012).

Producción de geosmina

Cuatro cepas presentaron secreciones transparentes posiblemente de geosmina, las cuáles fueron: BM-A, RPV-D, RPV-G y BPD-L. La geosmina es un metabolito volátil que producen en su mayoría los actinomicetos que pertenecen al género *Streptomyces* y este compuesto es el responsable de dar el olor característico a “suelo húmedo” (Bonifaz, 2012).

Tinción de Gram.

Todas las bacterias aisladas y purificadas resultaron Gram positivo (Cuadro 5), es decir que poseen una pared celular gruesa con varias capas interconectadas de peptidoglicano el cual tiene afinidad por el colorante cristal violeta (Bergey & Holt, 2000). Esta prueba también nos permitió identificar y diferenciar la morfología celular de las cepas. La familia de actinobacterias están definidas como Gram positivas (Chen et al., 2016).

Prueba bioquímica de catalasa.

Esta prueba determina la presencia de catalasa, que es un enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos. Todas las 12 cepas de actinomicetos presentaron formación de burbujas (Figura 6). Lo anterior indica que sintetizan catalasa e hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso (Aquiahuatl Ramos & Pérez, 2004). Según el manual de Bergey, la mayoría de género de actinomicetos son catalasa positiva, sin embargo se han reportado cepas de especies como *Rothia dentocariosa* y *Oerskovia* que en condiciones anaerobias dan como resultado reacciones negativas (Public Health England, 2015).

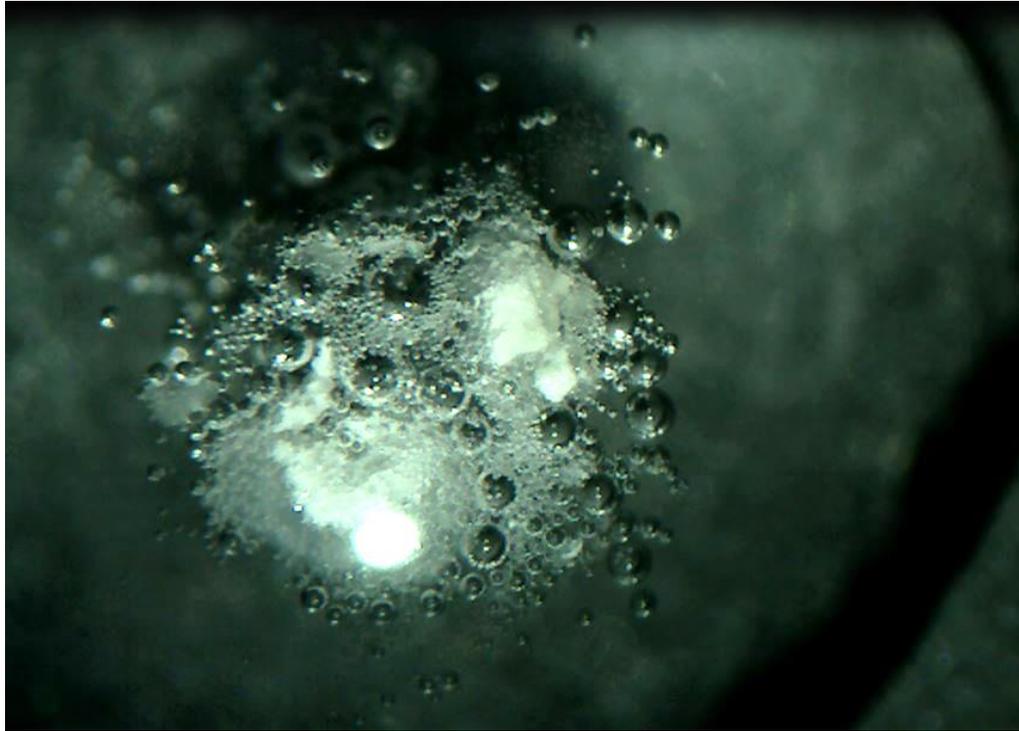


Figura 6. Prueba de catalasa en cepa de actinomiceto BM-A con resultado positivo observada bajo estereoscopio.

Prueba bioquímica de oxidasa.

Esta prueba nos permite determinar la presencia de enzimas oxidasa. Cuando hay presencia de un sistema citocromo-oxidasa la enzima oxidasa activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrógeno según la especie. Las 12 cepas de actinomicetos dieron resultados negativos como se muestra en la Figura 7, donde se observa un reacción incolora (Aquiahuatl Ramos & Pérez, 2004). Algunas cepas de actinomicetos han sido reportadas como citocromo oxidasa positivos, sin embargo los géneros *Streptomyces*, *Nocardia* y *Terrabacter* posiblemente identificados en este estudio, no poseen la enzima oxidasa y no pueden usar O_2 como último aceptor de electrones (Bergey & Holt, 2000).

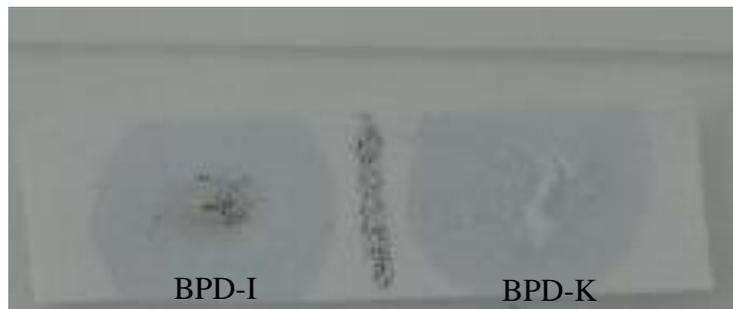


Figura 7. Prueba de oxidasa en cepas BPD-I y BPD-K con resultado negativo, reacción incolora.

Identificación de posibles géneros de los actinomicetos aislados.

En el Cuadro 3 se presentan imágenes de la tinción de gram de cada colonia aislada y la comparación con los géneros reportados en el Manual de Bergey y su posible género.

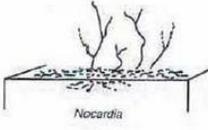
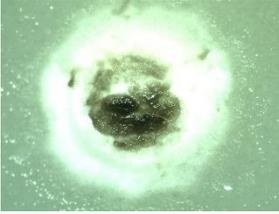
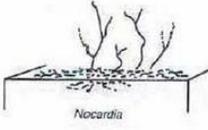
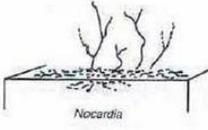
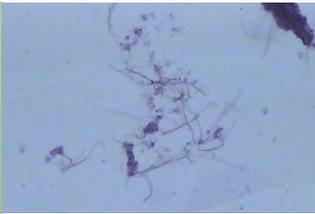
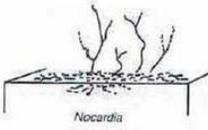
Los actinomicetos son bacterias que producen filamentos delgados y ramificados que se desarrollan en micelios individuales. Cada género de estos microorganismos presenta diferentes tipos de desarrollo como la septación de los filamentos, presencia y disposición del micelio vegetativo y la forma del micelio aéreo. Estas características nos permiten determinar la posible identidad a nivel de género (Dworkin, Falkow, Rosenberg, Schleifer, & Stackebrandt, 2006).

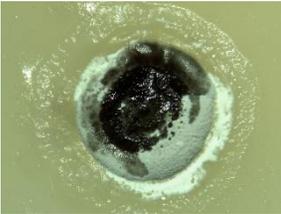
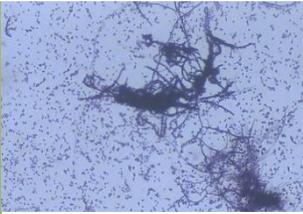
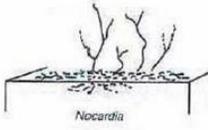
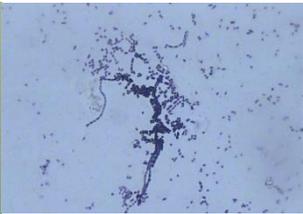
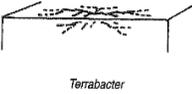
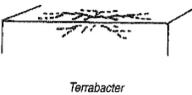
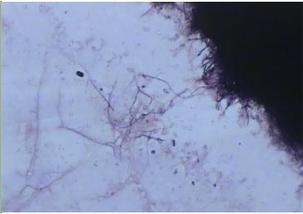
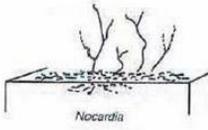
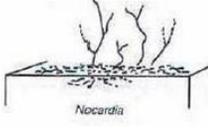
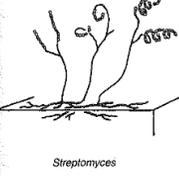
Se identificaron ocho cepas cuyo posible género es *Nocardia* que son bacterias aerobias, Gram positivo, incluso algunas especies presentan tinción de Gram variable. Son catalasas positivas, con hifas extensamente ramificadas, que generalmente presentan fragmentos y no son móviles. La apariencia colonial es variable dependiendo del medio de crecimiento, pueden ser granulares e irregular, arrugado o amontonado y los pigmentos que producen pueden tener varios tonos de naranja, roja y amarillo. También presentan un buen desarrollo en temperaturas de 20 °C hasta 45 °C (Bergey & Holt, 2000).

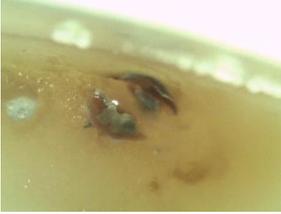
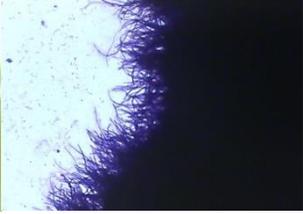
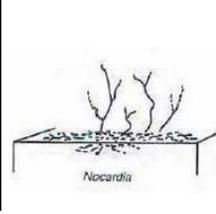
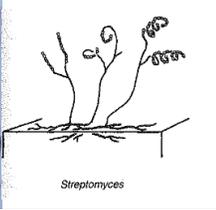
Terrabacter es el posible género de dos cepas, ambas aisladas de suelo perteneciente a la cobertura de rocas con poca vegetación en la RBU. Son bacterias aerobias estrictas y su morfología puede variar entre filamentos o cocoides, pueden tener movilidad, son gram positivas, catalasa positiva y oxidasa negativa. Crecen en temperaturas de 10 °C a 35 °C, siendo su temperatura óptima entre 25-30 °C. No producen ácido a partir de glucosa u otros azúcares en medios con estos componentes (Bergey & Holt, 2000).

Dos cepas aisladas de suelo de bosque de pino denso, presentan características morfológicas similares al género *Streptomyces*. Estas bacterias son gram positivas, con ramificaciones extendidas en todo el sustrato y micelio aéreo que forma cadenas desde tres a más esporas en cultivos maduros. Su apariencia en medios de cultivos sólidos puede ser granular, polvosa o aterciopeladas y puede producir pigmentos de colores difusos. Muchas cepas son capaces de producir una o más sustancias antibióticas. La mayoría de las especies utilizan una amplia gama de compuestos orgánicos como únicas fuentes de carbono para la energía y el crecimiento. La temperatura óptimo de crecimiento para la mayoría de especies es entre 25 °C a 35 °C (Bergey & Holt, 2000).

Cuadro 3. Características macro y microscópicas de actinomicetos y posible género

Cepa	Colonia de cultivo en placa inicial	Tinción de Gram	Manual de Bergey	Posible Género
BM-A				<i>Nocardia</i>
BM-B				<i>Nocardia</i>
BL-C				<i>Nocardia</i>
RPV-D				<i>Nocardia</i>

Cepa	Colonia de cultivo en placa inicial	Tinción de Gram	Manual de Bergey	Posible Género
RPV-E				<i>Nocardia</i>
RPV-F				<i>Terrabacter</i>
RPV-G				<i>Terrabacter</i>
BPD-H				<i>Nocardia</i>
BPD-I				<i>Nocardia</i>
BPD-J				<i>Streptomyces</i>

Cepa	Colonia de cultivo en placa inicial	Tinción de Gram	Manual de Bergey	Posible Género
BPD-K				<i>Nocardia</i>
BPD-L				<i>Streptomyces</i>

Pruebas de antagonismo.

De la totalidad de actinomicetos aislados (12), 10 cepas presentaron actividad antagónica contra al menos una cepa de bacteria patógena en la prueba. La cepa BPD-H no fue sometida a la prueba de antagonismo debido a contaminación de las colonias. Cuatro cepas fueron antagonistas contra la bacteria *Ralstonia Solanacearum*, tres cepas inhibieron la bacteria *Escherichia coli*, una cepa inhibió el crecimiento de *Salmonella* sp y ocho aislados mostraron actividad inhibitoria contra la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* (Cuadro 4). Estos resultados concuerdan con estudios de actinomicetos aislados de suelo de India con potencial antagónico que en mayor proporción inhibieron el crecimiento de bacterias Gram positivas, en comparación a Gram negativas (Panwar & Saini, 2012).

Las cepas que presentaron una inhibición parcial de crecimiento contra *Ralstonia Solanacearum* fueron BM-B con 0.5 cm, RPV-E con 1 cm, BPD-J con 1.5 cm (Figura 8), BPD-K con 1 cm y BPD-L con 1 cm de distancia inhibida. En el estudio de actinomicetos aislados de compost contra fitopatógenos de papa, de 85 actinomicetos aislados, 20 cepas resultaron tener actividad en contra de *Ralstonia solanacearum* (Pérez Rojas, León Quispe, & Galindo Cabello, 2015). Las dos cepas de posible género *Streptomyces* inhibieron ésta cepa patógena, lo que concuerda con la identificación del estudio antes mencionado, donde la cepa con mejor potencial inhibitorio pertenece a este género (Pérez Rojas et al., 2015).

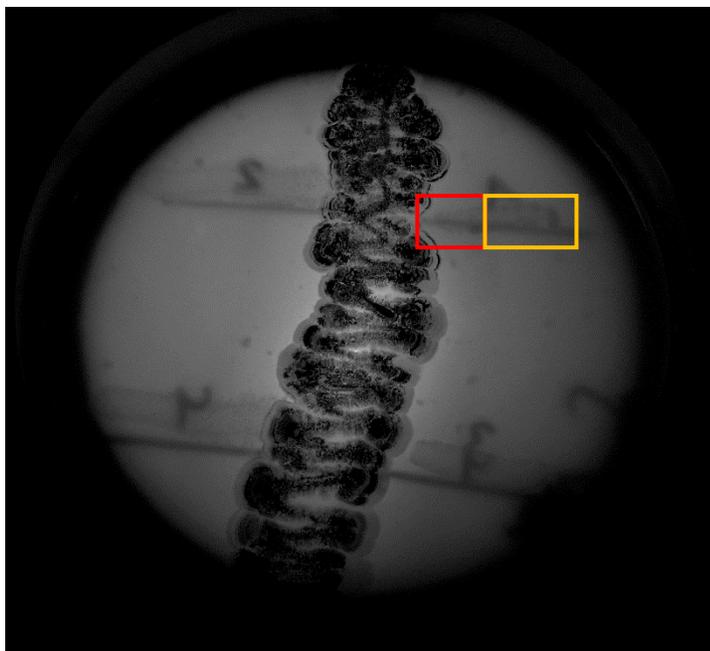


Figura 8. Actividad antagónica de cepa BPD-J de posible género *Streptomyces* contra *Ralstonia solanacearum*. Rectángulo rojo indica inhibición y amarillo indica crecimiento de la bacteria patógena.

Dos cepas de actinomiceto, BM-B (figura 9) y RPV-D posiblemente del género *Nocardia* inhibieron completamente el crecimiento de *Escherichia coli* (Cuadro 4). Existen especies como *Nocardia flavorosea* que han demostrado potencial antagónico contra *Escherichia coli* (Chun et al., 1998).

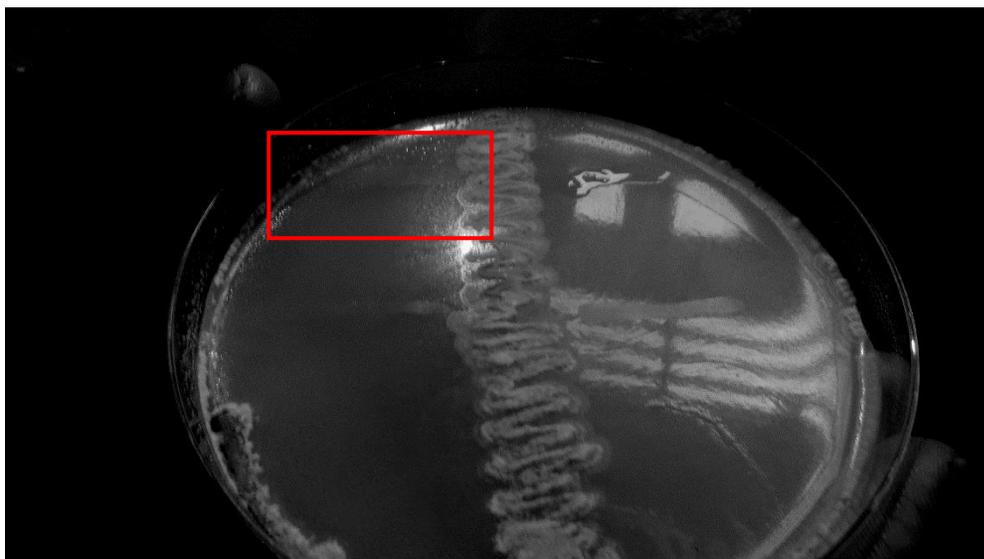


Figura 9. Actividad antagónica de cepa BM-B de posible género *Nocardia* contra *Escherichia coli*, inhibición completa.

Las cepas RPV-D de posible género *Nocardia* y RPV-F, posible género *Terrabacter* inhibieron completamente el desarrollo de la cepa patógena *Staphylococcus aureus* (Figura 10). Las cepas BM-A con 0.5 cm, BPD-I (Figura 11) con 1.3 cm y BPD-K con 2 cm inhibieron parcialmente esta cepa (Cuadro 4).

Existen estudios que han determinado que los metabolitos secundarios producidos por actinomicetos y que han sido aislados para probar su actividad antagónica contra bacterias Gram positivas y negativas, tienen mayor efecto contra bacterias Gram positivas (Kokare, Mahadik, Kadam, & Chopade, 2004). Las bacterias Gram negativas poseen mecanismos de resistencia como las bombas de expulsión, con lo cual evitan que el antibiótico llegue a su destino de acción. También llevan a cabo modificación enzimática del antibiótico, mecanismo frecuente en *Escherichia coli*, que poseen β -lactamasas de espectro extendido, las cuáles confieren resistencia a una serie de antibióticos (Tafur, Torres, & Villegas, 2008). Las bacterias Gram positivas no poseen porinas en su membrana externa, las cuáles son proteínas capaces de regular la entrada de algunos compuestos, entre ellos, los antibióticos (Tafur et al., 2008).

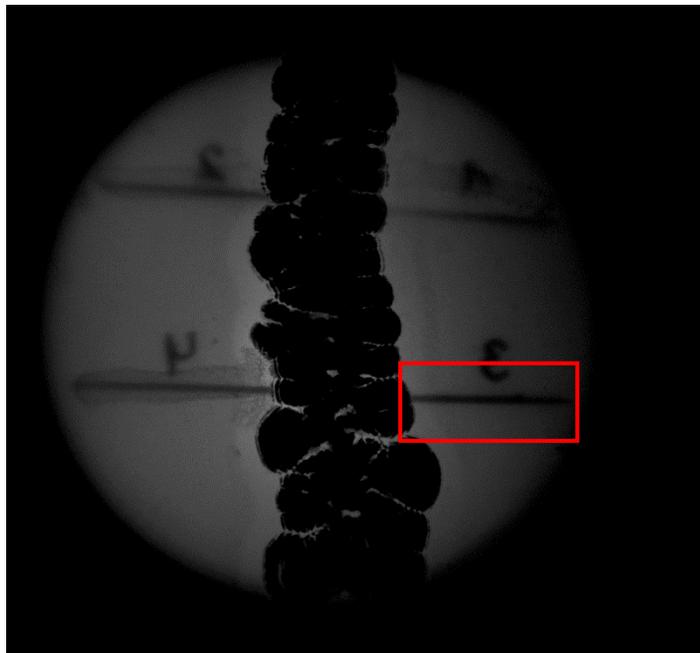


Figura 10. Actividad antagónica de cepa RPV-F de posible género *Terrabacter* contra *Staphylococcus aureus*.

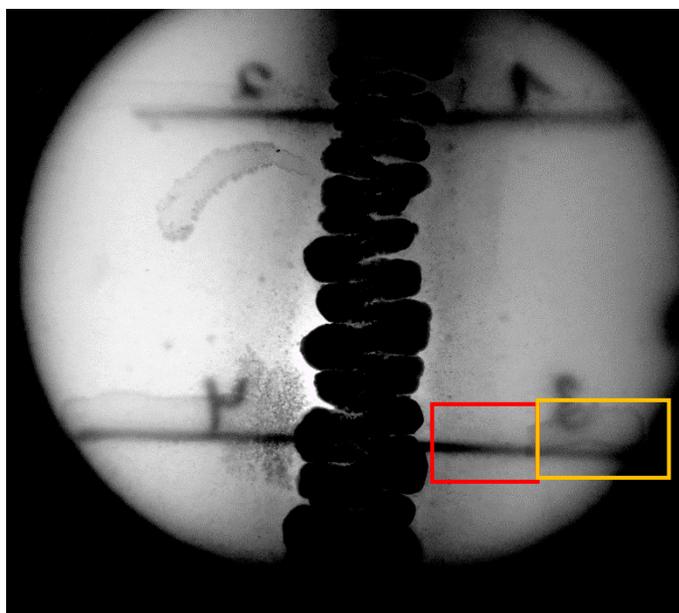


Figura 11. Actividad antagónica de cepa BPD-I de posible género *Nocardia* contra *Staphylococcus aureus*.

Salmonella sp. no mostró inhibición en su crecimiento al ser expuesta a la prueba de antagonismo junto con las 11 cepas nativas de actinomicetos (Cuadro 4). Estudios sobre *Salmonella* sp, aislada de carne de pavo realizados en Turquía en el año 2010, muestran que las cepas de la bacteria patógena aisladas fueron resistentes a varios antibióticos como la estreptomycinina, compuesto que proviene de cepas de *Streptomyces griseus* (Iseri & Erol, 2010).

Cuadro 4. Distancia de inhibición entre las cepas de actinomicetos contra bacterias patógenas (cm).

Cepa de actinomiceto	Posible Género	Cepa patógena			
		<i>Ralstonia Solanacearum</i>	<i>E. coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella</i> sp.
BM-A	<i>Nocardia</i>	0	0	0.5	0
BM-B	<i>Nocardia</i>	0.5	2.5	0.5	0
BL-C	<i>Nocardia</i>	0	0	0	0
RPV-D	<i>Nocardia</i>	0	2.5	2.5	0
RPV-E	<i>Nocardia</i>	1	0	0	0
RPV-F	<i>Terrabacter</i>	0	0	2.5	0
RPV-G	<i>Terrabacter</i>	0	0	2.5	0
BPD-I	<i>Nocardia</i>	0	0	1.3	0
BPD-J	<i>Streptomyces</i>	1.5	0	1	0
BPD-K	<i>Nocardia</i>	1	0	2	0
BPD-L	<i>Streptomyces</i>	0	1	0	0

Preservación de cepas mediante cultivo seriado.

Se estableció un cepario mediante cultivo seriado en frascos de vidrio con medio AVV, los cuáles no se cerraron completamente para evitar promover un ambiente anóxico dentro del mismo. Los frascos fueron rotulados y guardados en la incubadora a 28 °C en el laboratorio de Microbiología Ambiental (Figura 12).



Figura 12. Cepario en frascos con AAV guardados en la incubadora.

Preservación en suelo estéril.

Las 12 cepas fueron inoculadas en suelo estéril, en frascos debidamente rotulados y se guardaron en una refrigeradora a 8 °C (Figura 13).



Figura 13. Frascos para preservación de cepas de actinomicetos en suelo estéril.

Atlas de actinomicetos.

Se generó un atlas fotográfico y con los resultados generados en este estudio, el cual fue impreso en papel Pochteca® blanco brillante (Figura 14).

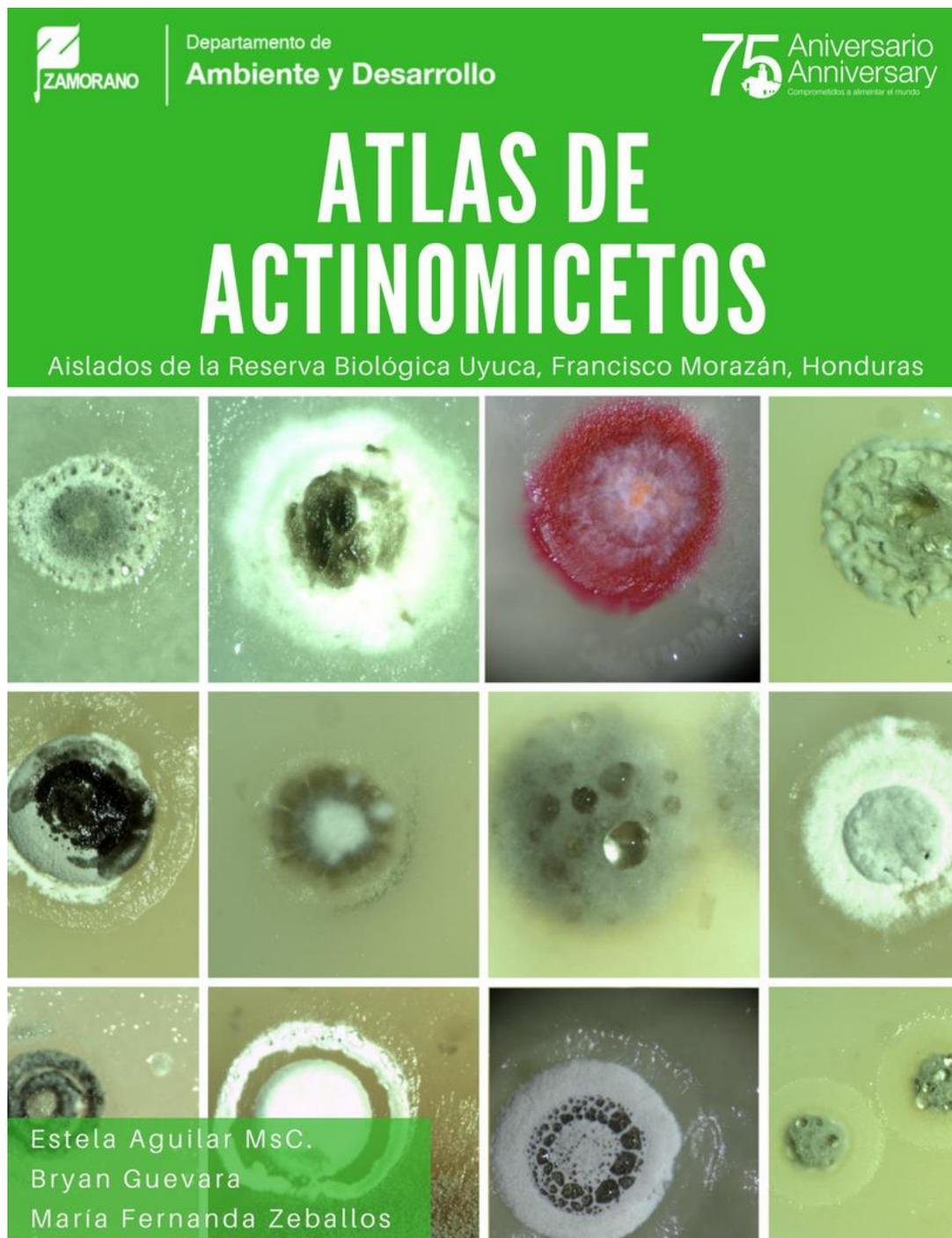


Figura 14. Portada del atlas de actinomicetos

4. CONCLUSIONES

- Las zonas con coberturas de rocas con poca vegetación y bosque de pino denso de la RBU, fueron los hábitats de donde se aislaron la mayor cantidad de cepas de actinomicetos.
- Se identificaron tres posibles géneros de actinomicetos presentes en las muestras de suelo de la RBU, los cuáles son *Nocardia*, con ocho cepas, *Streptomyces* y *Terrabacter* con dos cepas cada uno.
- La cepa que presentó mayor actividad antagónica contra la bacteria fitopatógena *Ralstonia solanacearum* fue la BPD-J, de posible género *Streptomyces*.
- La bacteria patógena Gram positiva *Staphylococcus aureus* fue la que más inhibición en su crecimiento presentó al ser sometida a la prueba de antagonismo junto con ocho cepas de actinomicetos, de posible género *Nocardia*, *Terrabacter* y *Streptomyces*.
- La cepa que inhibió por completo el desarrollo de las bacterias patógenas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* que afectan humanos fue RPV-D, de posible género *Nocardia* y la cepa BM-B, de posible género *Nocardia*, inhibió por completo el crecimiento de *Escherichia coli*.
- La bacteria patógena *Salmonella* sp. no fue inhibida por ninguna cepa de actinomiceto aislada de la RBU.
- Se generó el primer atlas de cepas nativas de actinomicetos aisladas de la RBU resaltando el potencial del sitio para estudios de bioprospección.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar muestreos de suelo de otras zonas de la RBU, como la zona núcleo, bosque de pino en regeneración, y otras coberturas vegetales para obtener cepas de actinomicetos, así como de otras zonas boscosas de Honduras, para obtener información más amplia de la presencia de estos microorganismos en diversos hábitats en todo el país.
- Realizar otras pruebas bioquímicas como solubilización de fosfatos, capacidad de fijar nitrógeno, producción de sideróforos, entre otras.
- Caracterizar molecularmente todas las cepas de actinomicetos para confirmar el género y la especie a las que pertenecen las cepas aisladas.
- Evaluar la actividad antagónica de las cepas de la RBU contra otras bacterias fitopatógenas y patógenas de humanos con el fin de determinar posibles antagonismos y en el futuro, el desarrollo de bio productos a base de estas bacterias.
- Extraer los metabolitos secundarios que producen estas cepas, para poder realizar análisis de su estructura química, y evaluar su actividad antagónica directa sobre otras bacterias patógenas como *Pectobacterium carotovorum*, que causa pudrición blanda y *Vibrio cholerae*, que causa cólera en humanos.
- Aplicar las pruebas de antagonismo que se realizaron in vitro en invernadero contra plantas infectadas por *Ralstonia solanacearum*.

6. LITERATURA CITADA

- Anandan, R., Dharumadurai, D., & Ponnusamy, G. (2016). An introduction to actinobacteria. In D. Dharumadurai, & Y. Jiang, *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications* (pp. 1-37). India: INTECH. doi:10.5772/62329
- Ángel Alarcón, D. I. (2006). *Evaluación de técnicas de conservación para hongos filamentosos y levaduriformes en el cepario de la Pontificia Universidad Javeriana*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Aquihuatl Ramos, M. d., & Pérez, M. d. (2004). *Manual de prácticas del laboratorio de microbiología general*. Iztapalapa: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Bergey, D. H., & Holt, J. G. (2000). *Bergey's manual of determinative bacteriology* (9th ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Bergey, D., Buchanan, R., & Gibbons, N. (1974). *Bergey's manual of determinative bacteriology* (6^a ed.). Baltimore: Williams & Wilkins Co.
- Betancor, L., & Yim, L. (2012). *Salmonella y salmonelosis*. Universidad de la República Uruguay, Departamento de Bacteriología y Virología. Uruguay: UDELAR.
- Bonifaz, A. (2012). *Micología médica básica* (5^a ed.). Monterrey: Mc Graw Hill.
- Cervantes, E., García, R., & Salazar, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*, 61(1), pp. 28-40.
- Chavan, D., Mulaje, S., & Mohalkar, R. (2013). A review on actinomycetes and their biotechnological application. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4, pp. 1730-1742.
- Chen, X., Jiang, Y., Li, Q., Han, L., & Jiang, C. (2016). Molecular phylogenetic identification of actinobacteria. In D. Dharumadurai, & Y. Jiang, *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications* (pp. 141-174). China: INTECH. doi:10.5772/62029
- Chun, J., Seong, C.-N., Sook Bae, K., Lee, K.-J., Kang, S.-O., Goodfellow, M., & Chil Hah, Y. (1998). *Nocardia flavorosea* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, pp. 901-905.

- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., & Stackebrandt, E. (2006). *The prokaryotes. A handbook on the biology of Firmicutes & Actinomycetes* (3^a ed., Vol. 3). USA: Springer Science.
- Evangelista Martínez, Z., & Moreno Enríquez, A. (2007). Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos. *Biotechnología*, 11(3), pp. 38-50.
- Fernández, A., García, C., Saéz, J. A., & Valdezate, S. (2010). *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. Madrid: EIMC.
- HiMEDIA laboratories. (2011). *Technical data-oatmeal agar*. India: Himedia Laboratories.
- Iseri, O., & Erol, I. (2010). Incidence and antibiotic resistance of *Salmonella* spp. in ground turkey meat. *British Poultry Science*, 51(1), pp. 60-66.
doi:10.1080/00071660903395379
- Jiang, Y., Li, Q., Chen, X., & Jiang, C. (2011). Large numbers of new bacterial taxa found by Yunnan Institute of Microbiology. *Chinese Science Bulletin*, 56(8), pp. 709-712.
doi:10.1007/s11434-010-4341-7
- Kokare, C., Mahadik, K., Kadam, S., & Chopade, B. (2004). Isolation, characterization and antimicrobial activity of marine halophilic *Actinopolyspora* species AH1 from the west coast of India. *Current Science*, 86(4), pp. 593-597.
- Latha, S., Vinothini, G., Calvin, D., & Dhanasekaran, D. (2016). In vitro probiotic profile based selection of indigenous Actinobacterial probiont *Streptomyces* sp. JD9 forenhanced broiler production. *Bioscience Bioengineering*, 121(1), pp. 124-131.
doi:10.1016/j.jbiosc.2015.04.019
- Lim, J., Seng, H., & Abd, M. (2007). Isolation and screening of actinomycetes from Malaysian soil for their enzymatic and antimicrobial activities. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science*, 35(1), pp. 159-164.
- Melgar, J., Rivera, J. M., Brown, J., & Weller, S. (2012). *Marchitez bacteriana en solanáceas: Su reconocimiento y manejo integrado*. Cortés: FHIA.
- Mora, J., López, L., Acosta, M., & Maradiaga, P. (2013). *Plan de Manejo Reserva Biológica Uyuca 2013-2025*. Honduras: Instituto Nacional de Conservación y Desarrollo Forestal, Áreas Protegidas y Vida Silvestre y Escuela Agrícola Panamericana.
- Panwar, D., & Saini, V. (2012). Antagonistic activity of soil actinomycetes against common human pathogens. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 3(4), pp. 500-506.

- Pérez Rojas, F., León Quispe, J., & Galindo Cabello, N. (2015). Actinomicetos aislados del compost y su actividad antagonista a fitopatógenos de la papa (*Solanum tuberosum* spp. andigena Hawkes). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 33(2), pp. 116-139.
- Public Health England. (2015). Identification of Aerobic Actinomycetes. *UK Standards for Microbiology Investigations*, 10(2), pp. 1-29.
- Rodriguez, Á. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, 44(5), pp. 464-475.
- Romero, T. (2009). *Cartografía y caracterización de ecosistemas de la Subcuenca del Río Cumes, Jesús de Otoro, Intibucá, Honduras*. Intibucá: EAP Zamorano.
- Salazar Loaiza, A., Ordoñez, C., Hernández, D., Castaño, L., Peña, K., Rodríguez, J., & Bueno, L. (2014). Actinomicetos aislados del suelo del Jardín Botánico de la Universidad de Pereira, Pereira, Colombia. *Scientia et Technica*, 19(2), pp. 223-229.
- Sharma, M., Dangi, P., & Choudhary, M. (2014). Actinomycetes: Source, Identification and their applications. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(2), pp. 801-832.
- Tafur, J. D., Torres, J. A., & Villegas, M. V. (2008). Mecanismo de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Asociación Colombiana de Infectología*, 12(3), pp. 217-226.

7. ANEXOS

Anexo 1. Medio Agar Avena (AAV)

Componente	Cantidad (g/L)
Avena en hojuelas	30
Agar bacteriológico	15
Agua destilada	1000 ml/L

Anexo 2. Fotografías de cepas iniciales de actinomicetos

