

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y
BIOTECNOLÓGICAS**

PROGRAMA PROFESIONAL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA



**EVALUACIÓN DE LA RELACIÓN DEL CRECIMIENTO DE UNA CEPA
NATIVA DE *Streptomyces spp.* Y LA PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS
NATURALES DE INTERÉS BIOTECNOLÓGICO**

Tesis presentada por la Bachiller:

Johany Cecilia Sánchez Guillen

Para optar el Título Profesional de:

Ingeniero Biotecnólogo

Asesor:

Ingeniero Javier Roque Rodríguez

AREQUIPA –PERÚ

2014



DEDICATORIA:

Con profundo amor:

A mis padres

***Quienes mantiene encendida en
mi la llama de la superación y
como testimonio viviente de un
mañana mejor.***



AGRADECIMIENTOS:

*A mis padres, por todo el apoyo
brindado durante el desarrollo
de mi vida.*

*Agradezco a mis maestros por
las enseñanzas brindadas*

ÍNDICE

RESUMEN	x
SUMMARY	xi
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA	3
1.2. OBJETIVOS	4
1.2.1.OBJETIVO GENERAL	4
1.2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
HIPÓTESIS	5
CAPÍTULO II.....	6
2.1.MARCO TEÓRICO	6
2.1.1.GÉNERO <i>Streptomyces</i>	6
2.1.1.1.La familia de los actinomicetos	6
2.1.1.2. Características genéticas de los <i>Streptomyces</i>	7
2.1.1.3. Ciclo de vida del género <i>Streptomyces</i> y producción de metabolitos secundarios	8
2.1.2.MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS	8
2.1.2.1. Identificación de bioquímica de microorganismos.....	9
2.1.2.2. Método ISP	9
2.1.2.3. Caracterización e identificación molecular	10
A.Aspectos generales de una reacción en cadena de la polimerasa	10
B.Electroforesis	15
C.Secuenciación de ADN.....	15
D.El gen 16 S y la caracterización molecular de bacterias	16
2.1.3.PIGMENTOS Y COLORANTES	18
2.1.3.1. Pigmentos naturales	19
2.1.3.2.Ensayo FT-IR.....	20
2.1.4.RELACIÓN ENTRE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS Y EL DESARROLLO Y CRECIMIENTO BACTERIANO.....	22
2.1.4.1. Pigmentos a partir de <i>Streptomyces</i>	22

2.1.4.2. Influencia de las condiciones de crecimiento establecidas y la producción de metabolitos secundarios.....	23
CAPÍTULO III	25
3.2.MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.2.1.MATERIALES	25
3.2.1.1.Material de estudio.....	25
3.2.1.2.Materiales de laboratorio, equipos reactivos y medios de cultivo	26
3.2.2. AMBIENTES DE TRABAJO:.....	28
3.2.3.MÉTODOS	28
3.2.3.1.Toma de muestra	28
3.2.3.2.Tratamiento de la muestra.....	28
3.2.3.3.Aislamiento primario de Actinomicetos.....	29
3.2.3.4.Aislamiento secundario	29
3.2.3.5.Caracterización microbiológica de la cepa <i>Streptomyces</i>	29
3.2.3.6.Caracterización bioquímica.....	30
3.2.3.7.Caracterización e identificación molecular.....	30
3.2.3.8.Extracción del pigmento.....	31
3.2.3.9.Determinación de óptimos de crecimiento en medio líquido.....	32
3.2.3.10.Determinación de la cinética microbiana en medio líquido.....	34
3.2.3.11.Determinación de la cinética microbiana en medio sólido.....	35
3.2.3.12.Determinación de óptimos de producción en medio sólido.....	35
3.2.3.13.Determinación de óptimos de temperatura para la producción de pigmentos	35
3.2.3.14.Determinación de óptimos de pH para la producción de pigmentos.....	36
3.2.4. CARACTERIZACIÓN DEL PIGMENTO	36
3.2.4.1.Ensayo de cambio de pH.....	36
3.2.4.2.Ensayo FT-IR.....	36
3.2.4.3.Pruebas de actividad de pigmento.....	37
□ Prueba de citotoxicidad en linfocitos humanos.....	37
□ Prueba de capacidad antioxidante usando el método FRP	38
□ Prueba de capacidad antimicrobiana en <i>staphylococcus aureus</i> , <i>escherichia coli</i> ..	38
CAPÍTULO IV	40
4.2.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40

4.2.1. TOMA Y TRATAMIENTO DE LA MUESTRA	40
4.2.1.1. Toma de muestra	40
4.2.1.2. Tratamiento de la muestra	42
4.2.2. AISLAMIENTO PRIMARIO	43
4.2.3. AISLAMIENTO SECUNDARIO	44
4.2.4. CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LA CEPA <i>Streptomyces</i>	45
4.2.4.1. Caracterización e identificación molecular	45
4.2.4.2. Caracterización bioquímica	52
4.2.4.3. Características macroscópicas:	54
4.2.5. EXTRACCIÓN DE PIGMENTO	56
4.2.6. EVALUACIÓN DE ÓPTIMOS DECRECIMIENTO EN EXTRACTO DE TIERRA	58
4.2.7. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA MICROBIANA EN MEDIO LÍQUIDO.	60
4.2.8. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA MICROBIANA EN MEDIO SÓLIDO	61
4.2.9. DETERMINACIÓN DE ÓPTIMOS DE PRODUCCIÓN EN MEDIO SÓLIDO	63
4.2.11. PRUEBAS DE ACTIVIDAD DE PIGMENTO	68
CAPÍTULO V	79
5.1. CONCLUSIONES	79
5.2. RECOMENDACIONES	80
REFERENCIAS	81
ANEXOS	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura1: Fases de la amplificación por PCR	13
Figura2: Etapas del proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación de ADNr 16S.....	17
Figura3: Cámaras de humedad en las cuales se colocaron las tres muestras de tierra previamente tratadas con carbonato de calcio	43
Figura4: Purificación de la bacteria 2.2.B. productora de pigmento de color amarillo – pardo. 4.a. micelio aéreo, 4.b. reverso de la placa de cultivo.....	45
Figura5: Aislamiento primario de la bacteria encontrada en la muestra B, perteneciente al campo de cultivo de maíz. 5.a. primer aislamiento, 5.b. cepa productora de pigmentos	45
Figura6: Árbol filogenético de la bacteria nativa de <i>Streptomyces</i> y las cepas y especies cercanas encontradas por comparación del gen 16 S en la base de datos Gen Bank del NCBI.....	48
Figura7: Ilustración del banco de datos de búsqueda Gen Bank del NCBI, en el cual las bacterias que tiene mayor similitud con la secuencia problema de la cepa nativa de <i>Streptomyces</i> se presentan en orden decreciente.	49
Figura8: Archivo Ab1 enviado por los laboratorios de secuenciación para su análisis y generación de árbol filogenético.....	50
Figura 9: Programa CLUSTALW2 utilizado para alinear secuencias múltiples de nucleótidos o proteínas, en el cual se colocó la secuencia de la cepa nativa de <i>Streptomyces</i> junto con las cepas encontradas y escogidas en el NCBI-BLAST.....	51
Figura10: Tinción Gram de la bacteria nativa de <i>Streptomyces</i> 2.2.B.	54
Figura11: Curva de producción o concentración del pigmento en 120 horas de crecimiento.	57
Figura12: Diferencia entre los rendimientos de crecimiento total después de 120 días a los diferentes factores de crecimiento. 12 a. evaluación de pH, 12.b. evaluación de temperatura, 12.c. evaluación de concentración de extracto de tierra, 12.d. evaluación de concentración de extracto de malta.	59
Figura13: Curva de crecimiento o cinética de crecimiento de la bacteria nativa de <i>Streptomyces</i> 2.2.B.	61

Figura14: Curva de crecimiento y cinética de la cepa nativa de <i>Streptomyces</i> en un medio sólido.	63
Figura15: Diagrama de producción de pigmento a diferentes valores de pH (15d.), temperatura (15 b.), % de extracto de malta (15 c.) y % de extracto de tierra.(15 a.)....	65
Figura16: Espectro IR del pigmento producido por la cepa nativa de <i>Streptomyces</i>	67
Figura 17: estructura básica de una melanina monómeros de su forma normal y oxidada 16.a. DHI y 16.b. DHICA.....	68
Figura 18: Placas de cultivo en las cuales se evaluó la posible actividad antimicrobiana del pigmento. 17. a. placa de evaluación en <i>E. Coli</i> , 17.b. placa de evaluación en <i>S. aureus</i>	70
Figura19: Cuadro de comparación entre el crecimiento de la bacteria y la producción de pigmento a los diferentes valores de pH de estudio.	71
Figura20: Diagrama de correlación de los pesos de crecimiento de bacteria y producción de pigmento.	72
Figura21: Relación entre el crecimiento de la bacteria y la producción de pigmento a los diferentes valores de temperatura estudiados.	73
Figura22: Correlación entre el crecimiento de la bacteria expresado en gramos por litro de medio y la producción de pigmento expresada en gramos por litro de medio a diferentes valores de Temperatura.....	73
Figura23: Comparación entre el crecimiento de la bacteria y la producción de pigmento a diferente concentración de extractos de tierra.	74
Figura24: Correlación del crecimiento de la bacteria y al producción de pigmento a diferentes concentraciones de extracto de tierra en el medio de cultivo.	75
Figura25: Comparación entre el crecimiento de la bacteria, expresada en peso seco de micelio, y la producción de bacteria.....	76
Figura26: Correlación entre la producción de pigmento y el crecimiento de la bacteria a diferentes valores de Extracto de Malta.	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Requerimientos para la preparación del medio almidón – caseína agar.	86
Tabla 2: Requerimientos para la preparación del medio ISP 2	87
Tabla 3: Preparación del medio ISP3 – Agar avena.....	87
Tabla 4: Preparación del medio ISP5: Glicerol – Asparragina Agar	88
Tabla 5: Preparación del medio ISP7: Agar Tirosina.....	88
Tabla 6: Preparación del medio ISP9: Medio de utilización de carbono	89
Tabla 7: Componentes de los medios para evaluar % de extracto de tierra.	32
Tabla 8: Componentes de los medios para evaluar % de extracto de malta.....	33
Tabla 9: Lugar de toma de muestra de tierra.	40
Tabla 10: Características de la zona de toma de muestra	41
Tabla 11: Características organolépticas de las muestras obtenidas	41
Tabla 12: Análisis fenotípico y macroscópico de tres bacterias obtenidas en las muestras de tierra que concuerden con las características generales de un <i>Streptomyces</i>	44
Tabla 13: Análisis de resultados fenotípicos del crecimiento en los medios propuestos por el ISP para caracterización de actinomicetos.	53
Tabla 14: Datos obtenidos de la caracterización bioquímica de la bacteria nativa de <i>Streptomyces</i> spp. 2.2.B.....	55
Tabla 15: Resumen de resultados y análisis de la actividad bioquímica de la cepa nativa de <i>Streptomyces</i> spp. 2.2.B.....	56
Tabla 16: Datos de pesos obtenidos de la producción de pigmento en variación del tiempo respecto al crecimiento de la cepa nativa de <i>Streptomyces</i> con un tiempo de crecimiento total de 120 horas.....	57
Tabla 17: Resultados del crecimiento de la bacteria nativa de <i>Streptomyces</i> spp. a diferentes factores de pH, temperatura, % de extracto de malta y % de extracto de tierra.....	58
Tabla 18: Pesos del micelio de la bacteria en relación al tiempo de crecimiento en horas, en un total de 120 horas o 5 días.	60
Tabla 19: Peso del micelio y del crecimiento de la cepa nativa de <i>Streptomyces</i> spp. ..	62

Tabla 20: Datos de la determinación de producción de pigmentos en gramos, a diferentes factores de crecimiento aplicados a la cinética de la bacteria nativa de <i>Streptomyces spp.</i>	64
Tabla 21: Evaluación de citotoxicidad en linfocitos humanos	69
Tabla 22: Datos de la prueba de capacidad antioxidante usando el método FRP	70
Tabla 23: Datos de prueba de actividad microbiana.....	70
Tabla 24: Relación entre la producción de pigmento y el crecimiento de la bacteria con el factor pH.	71
Tabla 25: Relación de pesos entre el crecimiento de la bacteria y la producción de pigmento	72



RESUMEN

El presente trabajo da conocer una bacteria nueva capaz de producir un pigmento, caracterizar la bacteria y el pigmento obtenido, y finalmente establecer una relación entre el crecimiento de la bacteria y la de producción del pigmento a determinadas condiciones de cultivo. Para ello, se aisló una bacteria de tierra de cultivo que pertenece al género *Streptomyces*, fue caracterizada bioquímicamente, por el método *International Streptomyces Project* ISP y molecularmente, por el análisis del gen ribosomal 16S. Se caracterizó el pigmento por similitudes encontradas en el espectro FT-IR, su solubilidad, cambio de pH en el medio y utilidad. Finalmente se evaluó a relación entre el crecimiento y la producción a diferentes valores de condiciones de cultivo como temperatura de 20°C, 28°C, 36°C, 40°C y 52°C. Un valor de pH de 5, 6, 7,8 y 9. Y la concentración de sustrato a un 25%, 30%, 40% y 50% v/v de extracto de malta y extracto de tierra. Se encontró de la batería nativa de *Streptomyces spp* 2.2. B. es nueva, se acerca mayormente a la especie caracterizada de *S. graminofaciens*. El pigmento coincide con las de una melanina. En la evaluación de su utilidad biotecnológica, se encontró que posee actividad antioxidante y que su citotoxicidad es baja (2mg/mL); sin no presenta actividad antimicrobiana. Finalmente se encontró que existe una relación directa entre el crecimiento y la producción del pigmento, siendo los óptimos una temperatura de 37°C, un pH de 7 y una concentración de extracto de tierra y extracto de malta de 30% y 40% v/v respectivamente.

Palabras clave: *Streptomyces*, pigmentos, relación, biotecnología.

SUMMARY

The present work aims to show a new bacteria which can produce a pigment, characterize the bacteria and the obtained pigment, and finally establish a relation between the growth of the bacteria and the production of the pigment in determined growth conditions.

For that purpose, a bacterium was isolated from corn field, which belonged to the *Streptomyces* genera, and was characterized biochemically by the ISP methods and molecularly using the ribosomal 16S gene. The pigment was characterized by its FT-IR spectra similitude with other pigments, their solubility and utility. Finally the relation between the growth and the production was evaluated in different growth conditions as temperature 20°C, 28°C, 36°C, 40°C y 52°C. A pH value of 5, 6, 7,8 y 9. And a substrate concentration of 25%, 30%, 40% y 50% v/v of soil extract and malt extract.

We obtained a new bacterium of the genera *Streptomyces* is new and its characteristics are the most similar to the *S. graminofaciens* species. The pigment belongs to the melanin type, determined by its appealing characteristics. His biotechnological utility was evaluated, we found that the pigment has antioxidant activity and its cytotoxicity is low (2 mg/ mL); however the pigment didn't show any antibiotic activity against any of the analyzed bacteria. Finally a direct relation between the growth and the production was found and the optimum values of growth were: a temperature of 37°C, a p value of 7, and a soil and malt extract concentration of 30% and 40% v/v respectively.

Key words: *Streptomyces*, pigments, relation, biotechnology.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Desde un principio, la presencia de color y el uso de colorantes han sido indispensables para el ser humano. Obtenidos inicialmente de fuentes primas animales y vegetales, pero debido a su bajo rendimiento, se inició la búsqueda de otras fuentes naturales y sintéticas. Por mucho tiempo, la producción de colorantes a partir de reacciones químicas fue la opción más adecuada para satisfacer la demanda de colorantes en el mundo, pero su fabricación era peligrosa, y sus residuos eran tóxicos para el hombre y el medio ambiente, por lo que los pigmentos y colorantes naturales eran nuevamente una opción favorable. La investigación de estos colorantes enfocó entonces su interés en los microorganismos, su fácil producción y purificación, y la posibilidad de mejorar la producción y rendimiento, representaban una mejor opción en comparación a los productos animales y vegetales, además, su fácil degradación y características adicionales, como capacidad antioxidante o antimicrobiana, los volvía más apetecibles en relación a su contraparte sintética^{1, 2}.

Dentro de este grupo de microorganismos, el género *Streptomyces* era mayormente conocido por su capacidad de producir una amplia gama de antibióticos, representando el 60% de los antibióticos conocidos, y aproximadamente el 90% son utilizados por el hombre. Sin embargo, también son capaces de producir otros metabolitos como enzimas, y pigmentos. Estos últimos, desde la década de 1963, fueron utilizados para la caracterización e identificación de especies y sub especies dentro del protocolo *International Streptomyces Project (ISP)*³, un esfuerzo conjunto de investigadores por sistematizar las características únicas presentes en la familia de los actinomicetos y del genero *Streptomyces*.

Fue únicamente a partir del siglo XXI, que se realizaron investigaciones para identificar y caracterizar estos pigmentos, los cuales se presentaron como adecuados para la tinción de

telas, como antibióticos, antioxidantes e incluso, algunos pigmentos eran factores anticancerígenos. Los pigmentos a partir del género *Streptomyces* empezaron a cobrar interés, y se realizaron más investigaciones respecto a sus posibles usos, estructura y naturaleza, sin embargo, no se comprendía en su totalidad el mecanismo de producción y factores influyentes en la producción de estos pigmentos naturales.

El objetivo de este trabajo, es el aislamiento e identificación de una cepa nativa de *Streptomyces* de la región Arequipa, la obtención y caracterización del pigmento producido, la evaluación de su utilidad biotecnológica por medio de su actividad antioxidante, citotoxicidad y capacidad antimicrobiana, y establecer una relación entre el crecimiento y la producción del pigmento en determinadas condiciones de pH, temperatura, concentración de extracto de malta como fuente de carbono y concentración de extracto de tierra como fuente de sales en el medio.



1.1.DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

1.1.1. Área del conocimiento

- Área general: Ciencias de la Salud
- Área específica: Biotecnología
- Especialidad: Microbiología

1.1.2. Operacionalización de variables.

VARIABLE		INDICADORES
VARIABLE INDEPENDIENTE	Cepa nativa de <i>Streptomyces</i> spp. perteneciente a la región Arequipa	Caracterización morfológica
		Caracterización Bioquímica
		Caracterización Molecular
		Crecimiento óptimo
VARIABLE DEPENDIENTE	Pigmento producido por la bacteria nativa de <i>Streptomyces</i> spp.	Caracterización del pigmento
		Utilidad
		Producción óptima

1.2.OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la relación entre el crecimiento de una cepa nativa de *Streptomyces spp.* Y la producción de pigmentos naturales de interés biotecnológico.

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar y caracterizar una cepa nativa de *Streptomyces*
- Aislar y caracterizar el pigmento natural producido por la cepa nativa de *Streptomyces*.
- Observar la utilidad biotecnológica del pigmento extraído evaluando la citotoxicidad en linfocitos humanos, actividad antioxidante y actividad antimicrobiana en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.
- Evaluar la relación entre el crecimiento de la cepa nativa de *Streptomyces* y la producción de pigmentos naturales.

HIPÓTESIS

DADO QUE la bacteria nativa de *Streptomyces spp.* Es capaz de producir un pigmento natural

ES POSIBLE que exista una relación directa entre el crecimiento de la bacteria y la producción de un pigmento y que este presente utilidad biotecnológica.

CAPÍTULO II

2.1. MARCO TEÓRICO

2.1.1. GÉNERO *Streptomyces*

2.1.1.1. La familia de los actinomicetos

Los actinomicetos son bacterias aeróbicas, Gram positivas, filamentosas y parcialmente ácido resistentes. Son heterótrofas, es decir, son capaces de utilizar diversas fuentes de carbono simple, complejo y compuestos moleculares orgánicos como ácidos azúcares, polisacáridos, lípidos, proteínas e hidrocarburos alifáticos. Estos microorganismos están distribuidos ampliamente en la mayoría de suelos secos y cálidos donde alcanzan grandes cantidades poblacionales. El orden de los Actinomycetales comprende 63 géneros constituyendo, aproximadamente del 20-60% de la población microbiana de suelo.⁴

Dentro de sus características específicas, presentan un olor típico a suelo húmedo por la producción de un metabolito llamado geosmina. Además son capaces de producir terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares hidrofílicas o ligninolíticas con las que es posible degradar la materia orgánica de origen vegetal y animal por lo cual son miembros importantes del sistema de descomposición del suelo.^{5,6}

Estas bacterias son los microorganismos más estudiados dentro del orden de los actinomicetos, siendo el género *Streptomyces* el más conocido. Dentro del género *Streptomyces*, existen más de 500 especies descritas, y constituye uno de los grupos más numerosos y con mayor diversidad, las cuales se encuentran comúnmente habitando los suelos y vegetación en estado de descomposición, a pesar de que existen reportes de encontrarse también en ambientes acuáticos.⁷ El género *Streptomyces* pertenece a la familia *Streptomycetaceae*, del suborden *Streptomyceae*, del orden *Actinomycetales*, del filo *Actinobacteria*. Este género es el más extenso de las actinobacterias, un grupo de bacterias Gram positivas. presentan una morfología filamentosas similar a los hongos, con quienes son usualmente confundidos; esto se debe a su complejo ciclo celular, que comprende una diferenciación morfológica y bioquímica, que permite la formación de

micelio y esporulación, y la producción de una gran variedad de metabolitos secundarios de interés para tanto ciencia básica como aplicada.⁸

Son mejor conocidos por su importancia en la medicina y farmacología, ya que sus vías metabólicas secundarias producen más de la mitad de los compuestos bioactivos usados, incluidos antibióticos, agentes anticancerígenos, drogas antiparasitarias, anti fúngicas, inmunosupresores y herbicidas. También juegan un rol crucial en mantener el balance de la biosfera descomponiendo residuos insolubles de otros organismos como la lignocelulosa y quitina. Recientemente, las bacterias de este género han sido usadas en la industria como un nuevo sistema huésped para la expresión de proteínas heterogéneas que resulta en mejores maquinarias y bioprocesos *downstream* más simples en la obtención de productos biotecnológicos.⁹

2.1.1.2. Características genéticas de los *Streptomyces*

Las bacterias de este género poseen un cromosoma lineal de gran tamaño, el cual varía entre 8 y 9 Mega pares de bases (Mbp) en función de la especie, casi el doble del perteneciente a otras bacterias como la *Escherichia coli* o el *Bacillus subtilis*, además en contenido de guanina +citosina presente en su material genético alcanza un porcentaje del 70 a 74 %, lo que es elevado. El descifrado del código genético del *Streptomyces coelicolor*, el ejemplar mejor estudiado en 2002 abrió una oportunidad para la exploración de sistemas de componentes celulares. La duplicación de genes y transferencia lateral de genes son consideradas como las fuerzas más importantes en la evolución genómica en las bacterias. La duplicación genética es de vital importancia para la innovación funcional.¹⁰

Existe similitud entre los genomas de las diferentes especies de *Streptomyces*, en estudios de comparación de cinco especies cercanas, los genes relacionales a la producción de metabolitos secundarios y diferenciación morfológica son conservados, indicando similitud en los mecanismos que estas comparten las cuales están controladas por condiciones nutricionales como el carbono, nitrógeno entre otros. También se sugirió que presentan una frecuente duplicación de genes o transferencia lateral de genes, lo cual jugaría un rol importante en la diversificación del genoma en este género.¹¹

2.1.1.3. Ciclo de vida del género *Streptomyces* y producción de metabolitos secundarios

El ciclo de desarrollo del género *Streptomyces* es complejo, ya que involucra una fase de diferenciación en la cual la bacteria adquiere un micelio y puede generar esporulación, este proceso ha sido ampliamente estudiado en medio sólido, debido a que en cultivos líquidos la mayoría de las cepas no son capaces de esporular. Las estructuras diferenciadas en cultivo son: un micelio sustrato y otro aéreo o reproductivo siendo en ese último donde se generan las esporas.¹¹

Una vez que la espora germina, se origina el micelio sustrato, un tramado de hifas ramificadas que se diseminan a través del sustrato sólido, el cual a su vez está separado en micelio primario, o el micelio joven, y el micelio segundo, que es el precursor del micelio aéreo; en este crecimiento vegetativo, se produce la transformación de los nutrientes disponibles en el medio, que luego serán usados para la formación de hifas menos ramificadas que conformarán el micelio aéreo. Queremos destacar en esta sección la importancia de la diferenciación y crecimiento del género *Streptomyces*, y el papel que esta cumple en la producción de metabolitos secundarios. Su capacidad de liberación de nutrientes al medio, junto con su versatilidad metabólica, hace de estas bacterias atractivas a la posibilidad de producción y obtención de metabolitos secundarios con posibles aplicaciones industriales, como por ejemplo: antibióticos, inhibidores enzimáticos, herbicidas, pigmentos, aromas, etc.¹²

La síntesis de metabolitos secundarios de interés, mayormente son generados al comienzo de la diferenciación morfológica y la formación de micelio aéreo. Sin embargo, en el caso de desarrollo del micelio en un medio líquido, la fase vegetativa se alarga considerablemente.¹³ Es por esta razón que recalcamos la importancia de esta sección en este trabajo de investigación, que también será tomada en cuenta en la discusión, más adelante.

2.1.2. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

El desarrollo de la microbiología se ha logrado mediante el estudio de especies asiladas, crecidas en medios desprovistos de cualquier otra forma de vida contaminante. Los

microorganismos necesitan nutrientes apropiados así como condiciones ambientales favorables. En primer lugar el medio de cultivo debe contener aquellos nutrientes esenciales para el crecimiento de una determinada especie.

2.1.2.1. Identificación de bioquímica de microorganismos

La mayor parte de las pruebas usadas para evaluar la actividad bioquímica y metabólica de bacterias, se lleva a cabo mediante el subcultivo del aislamiento primario en una serie de medios diferenciales cuyos resultados pueden interpretarse después de uno o dos días de incubación.¹⁴ Los medios utilizados en el presente trabajo para la caracterización bioquímica de una cepa nativa y posiblemente nueva de *Streptomyces* serán descritos a continuación.

2.1.2.2. Método ISP

Dentro del género de los actinomicetos, la familia de los *Streptomyces* representa el mayor número de especies y variedades en la naturaleza, los cuales difieren mucho en su morfología, fisiología y actividades bioquímicas. Además, estas bacterias son de gran interés ya que en esta familia se encuentra la mayoría de actinomicetos productores de antibióticos; esto resultó en la búsqueda, aislamiento e identificación de nuevas cepas de *Streptomyces* alrededor del mundo, requiriendo así nuevas divisiones, en subgéneros y especies.¹⁵

En un intento de realizar dichas separaciones, algunos autores consideraron ciertas características importantes como la morfología, incluyendo la estructura del micelio interior, la formación y naturaleza del micelio aéreo, la estructura y formación de esporas en la superficie miceliar; además de otras características de cultivo, como la formación de pigmentos solubles, la utilización de medios con composiciones diferentes, como diferentes fuentes de carbono y nitrógeno. Además de una adecuada identificación, algunas características fisiológicas como el rango de temperatura de crecimiento, degradación de amilasa, gelatina, inositol y ramnosa, y la reducción de nitratos son también consideradas necesarias para la clasificación de nuevas cepas aisladas. De esta forma la comparación entre características fisiológicas de una nueva cepa aislada, con otras cepas ya identificadas permite una cercanía a estas, y su identificación definitiva, encajando en uno de estos

grupos; de lo contrario, creando uno nuevo al cual respondan bacterias las cuales sean descubiertas en un futuro. ¹⁵

Es así que para la época en la que se creó el *International Streptomyces Project*, no existía ninguna guía estructurada que pudiera determinar cuál era la formulación de medios, condiciones de crecimiento, propiedades morfológicas a observar, etc. Fue entonces cuando un grupo de dedicados taxonomistas organizaron y participaron en el ISP, un proyecto internacional que permite describir los cultivos nombrados como *Streptomyces* disponible para el público, o colecciones privadas. Los métodos y medios, desarrollados por Shirling & Gottlieb en 1966, son todavía muy útiles y recomendados para la caracterización de *Streptomyces* spp. La disponibilidad de los medios utilizados en el ISP aumentó dramáticamente cuando los laboratorios Difco produjeron versiones deshidratadas de cada uno de los mismos. Así, nuevas descripciones fueron preparadas para más de 400 cultivos diferentes, examinados de forma conjunta con otros investigadores. Las publicaciones de caracterización por medio de ISP permanecen como la mejor manera de describir a un grupo de actinomicetos. ⁴

Entre las condiciones de trabajo, características como determinar la forma de cultivar una bacteria en particular es importante. Determinar el género y especie de una bacteria en particular podría cobrar interés si esta bacteria produce algún metabolito secundario. Determinar tanto la forma, como el color de cada uno de sus componentes morfológicos es el primer paso a tomar para su caracterización. De esta manera, se podrá observar micelios rugosos, lizos elevados, planos, así como esporas conjuntas, espirales. Finalmente son sus características bioquímicas las que determinan con certeza la especie a la cual pertenecen. ¹⁶

2.1.2.3. Caracterización e identificación molecular

A. Aspectos generales de una reacción en cadena de la polimerasa

Inventada por K. Mullis y sus colaboradores en 1985, la reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés PCR, es una reacción enzimática cuya función es amplificar o clonar millones de veces una secuencia específica de ADN. Durante este proceso, la enzima ADN polimerasa, presente en todas las células, utiliza como sustrato nucleótidos libres de A, T, C y G para formar una copia de la cadena de ADN previamente separada en el proceso por medio de la elevación de la temperatura. ¹⁷

Esta reacción se denomina una PCR básica, es decir, la copia de una molécula de ADN a otra de ADN; pero, utilizando una enzima diferente, la transcriptasa reversa, encontrada mayormente en virus retrovirales se aplica una tecnología llamada RT-PCR, o transcripción reversa, la cual utiliza cadenas de ARN y las transforma en moléculas de ADN.¹⁷

a. Elementos de la reacción

Los elementos básicos de una PCR son: el *template* o molde, la secuencia de ADN la cual se desea replicar; la enzima, que puede ser tanto ADN polimerasa como transcriptasa reversa; los primers y por último los nucleótidos: adenina, timina, citosina y guanina; el ion magnesio, una solución amortiguadora o buffer y agua. Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de la que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión. Finalmente el equipo utilizado, llamado termociclador, convierte la reacción en automatizada, controlando la temperatura y el tiempo de la reacción.¹⁸

- i. **El ADN molde:** es el elemento principal de la PCR. Está conformado por tres componentes: las bases nitrogenadas, que pueden ser púricas (adenina o guanina), o pirimidínicas (citosina o timina), unidas a una azúcar pentosa por un enlace N-glucosídico, y un grupo trifosfato unido por un enlace diéster. La carga eléctrica del ADN es negativa gracias a los grupos fosfatos que posee. En el proceso de PCR, las cadenas de ADN se separan y funcionan como molde para que la enzima sintetice las nuevas cadenas.¹⁸
- ii. **La enzima Polimerasa:** La enzima polimerasa es el catalizador de la reacción, la cual sintetiza las nuevas cadenas; la enzima usada con más frecuencia se llama Taq ADN polimerasa, que proviene de una bacteria termófila llamada *Thermusaquaticus*, la cual vive en condiciones de temperatura muy altas y debido a esta razón es utilizada en la reacción, ya que se le considera una enzima termoestable. Esta enzima es comercialmente eficiente, pero para que la enzima funcione de la manera son necesarios elementos como primers, dNTPs, Mg²⁺, buffer y agua.¹⁹
- iii. **Los primers:** Los primers son secuencias de oligonucleótidos que delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementos a esta. Su tamaño es generalmente entre 15 a 25 pares de bases y la cantidad de G-C no debe ser

más del 55% de la secuencia. Por lo tanto, las secuencias de primers que deben usarse en la PCR deben ser diferentes. Una es denominada *forward* y a otra *reverse*, ambas diseñadas para que puedan hibridar o se unan a la molécula molde y las cadenas puedan ser extendidas por la ADN polimerasa en dirección 5'-3'.¹⁹

- iv. **Los nucleótidos:** Los dNTP's son los ladrillos o bases nitrogenadas de la reacción, con los que la Taq polimerasa construye las nuevas copias de la cadena molde, contribuyen a la especificidad de la reacción, su concentración es importante ya que pueden afectar la función de la Taq polimerasa; por lo que se utilizan usualmente en una concentración entre 0.2 a 1.0 mM²⁰
- v. **Buffer de solución:** El buffer de solución amortiguadora está compuesto de Tris-Cl a pH 8. El magnesio, es un cofactor enzimático de la Taq polimerasa, que también influye en la especificidad de la reacción, por eso debe tener una concentración adecuada para no afectar la reacción o el rendimiento de la enzima. Su concentración se encuentra entre los 0.5 y los 2.5 mM En ocasiones, el buffer viene incluido con el magnesio; el agua es el disolvente de la reacción y se usa libre de nucleasas, enzimas que degradan a los ácidos nucleicos.²⁰

b. Sistema de reacción

El sistema de replicación consiste básicamente en las copias repetidas de una secuencia de ADN, a través de ensamblado de una secuencia complementaria a la secuencia molde, las nuevas secuencias copias a su vez, sirve de molde para una nueva replicación en los ciclos que siguen en la reacción; por lo que se denominaría una reacción exponencial. En la primera ronda de amplificación, los productos de ADN presentan diferentes tamaños, algunos productos inespecíficos; pero en la segunda ronda, se generan moléculas de ADN de longitud definida que se acumulan de forma exponencial en rondas posteriores de amplificación; por lo que se podría deducir el número de copias total por medio de la siguiente ecuación.²¹

$$(2^n - 2n)x$$

Donde n es el número de ciclos, $2n$ es el rendimiento de la reacción de PCR, y x es el número o concentración del ADN molde inicial. De esta forma, al cabo de 20 ciclos de

PCR habrá una amplificación de 2^{20} veces, suponiendo que cada ciclo tiene un rendimiento del 100%. El rendimiento de una PCR varía de un ADN molde a otro y depende del grado de optimización que se haya conseguido. ²¹

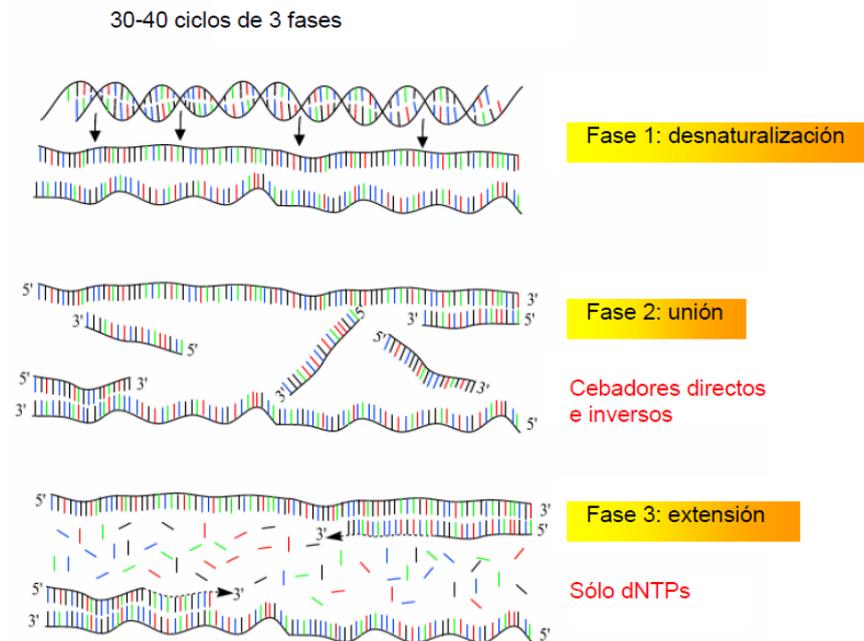


Figura1: Fases de la amplificación por PCR ¹⁶

En secciones anteriores se ha hablado de las fases básicas de un ciclo de reacción de PCR: desnaturalización, hibridación y extensión; lo que se explicara a continuación.

i. Desnaturalización

En esta etapa, la doble hélice del ADN se separan a una temperatura de 95°C durante 20 a 30 segundos, la hebra única se denomina ADN monocateriano, el tiempo depende mucho de la secuencia molde; si la cantidad de G-C es alta, se necesitara más tiempo, ya que se tiene tres enlaces de puente hidrogeno que romper, a diferencia de las uniones A-T; por lo que se necesitaría más energía; el tiempo para la que la mitad del ADN pueda separarse se denomina como temperatura de fusión (Tf). El proceso de desnaturalización también depende de factores como el tipo de solvente, la concentración de sales y el pH

utilizado. También depende mucho de la rapidez con la que el termociclador aumenta la temperatura. El objetivo de esta etapa es la completa separación de las cadenas de la molécula molde para el siguiente paso.¹⁹

ii. Hibridación

En esta etapa, el ADN monocatenario vuelve a unirse a una menor temperatura, es en este momento que los primers o cebadores, que se encuentran libremente en la reacción, se unen a las moléculas template desde el extremo 3'; y es este pequeño fragmento bicatenario que sirve de molde, donde puede unirse la ADN polimerasa para la elongación. La temperatura adecuada para esta reacción se denomina temperatura de hibridación o temperatura *melting* (T_m), esta se halla por medio de una fórmula, pero usualmente oscila entre los 50-60°C. Si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura de hibridación es la adecuada, la unión y estabilidad entre los primers y la secuencia molde serán óptimas, y se realizará la replicación de forma eficiente.²⁰

iii. Extensión

Una vez unidas la molécula molde y los primers, la enzima Taq polimerasa puede actuar. Esta se une al complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agregando dNTP's complementarios a la cadena molde, para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, de 5' a 3', donde las bases se unen al cebador desde su extremo 3', por lo que también se puede decir que lee de 3' a 5'. La duración del tiempo de extensión del cebador puede aumentar dependiendo del tamaño de la cadena molde; sin embargo, mayormente es utilizado un tiempo de 1 minuto. La temperatura óptima para la reacción es de 72°C; ya que esta temperatura es la óptima funcional de la enzima. Al final de este ciclo, se habrán formado las copias del ADN molde; y el proceso se repetirá nuevamente, lo que se denominará un 'ciclo'. La reacción de PCR tiene un promedio de 30 a 35 ciclos para la producción de la cadena de ADN, el cual aumenta su cantidad exponencialmente.²¹

B. Electroforesis

Una vez terminada la reacción; se obtendrán copias exactas de la secuencia molde. El objetivo de la PCR es la superproducción de una sola cadena de interés, es decir, aumentar su concentración millones de veces; pero es necesario tener la certeza que el producto obtenido es la secuencia objetivo y no productos indeseados. La técnica utilizada para su comprobación es la electroforesis en gel de agarosa.²⁰

La electroforesis consiste en la separación de grandes moléculas como los ácidos nucleicos a través de una matriz que funciona como un filtro para separar las moléculas de acuerdo a su tamaño y carga. Esta separación se hace usando buffer TAE o TBE. El ADN, gracias a sus grupos fosfato, tiene carga negativa, por lo que en la electroforesis migran del polo negativo al positivo. Cuando los amplicones son corridos se les coloca junto a un marcador molecular el que permite la identificación de amplicones por su tamaño; para revelar la posición del ADN en el gel de agarosa, se usa un revelador llamado Bromuro de Etidio, que genera una luz fluorescente bajo la luz ultravioleta.²²

La combinación adecuada de estos elementos químicos hacen posible la síntesis *in vitro* de ADN utilizando la PCR. A partir de este objetivo básico, se han realizado modificaciones y logrado diferentes aplicaciones para la tecnología de la PCR, que han beneficiado enormemente a los campos de la medicina e investigación científica; en la actualidad, los usos más comunes para esta reacción son: la amplificación enzimática o clonación de una región específica de ADN, la detección e identificación de genes para el diagnóstico de enfermedades y medicina legal, la investigación de expresión de genes, entre otras.²³

C. Secuenciación de ADN

Desde la elucidación de la estructura del ADN por Watson y Crick, en 1953, despertaron incógnitas respecto a su composición, comportamiento y funciones en el cuerpo vivo. El ADN está compuesto por ácidos nucleicos, polímeros lineales de nucleótidos, su longitud es variable, desde 80 nucleótidos, como el tARN (ARN de transferencia), hasta los 10^8 pares de nucleótidos que conforman un cromosoma eucariótico. Con la tecnología que se posee en la actualidad, los laboratorios de investigación tienen la facilidad de secuenciar millones de nucleótidos por día, tarea imposible no hace tres décadas antes. Son por estas

razones que la tecnología de la secuenciación es tan importante en la investigación referente al ADN.²¹

En general, la estrategia básica de secuenciación de ácidos nucleicos es idéntica a la utilizada para la secuenciación de las proteínas: el fraccionamiento de las cadenas en partes más pequeñas que puedan ser secuenciadas, la secuenciación de estos fragmentos pequeños, y por último el ordenamiento de estos fragmentos que se traslapan unos con otros en el punto de corte de la serie anterior. El primer fragmento en ser secuenciado mediante este método fue el tARN^{Ala} de levadura, en 1977. Poco tiempo después, Frederick Sanger y sus colaboradores desarrollaron técnicas de secuenciación más rápidas y simples.²⁴

D. El gen 16 S y la caracterización molecular de bacterias

Los ácidos nucleicos y proteínas con documentos de la historia evolutiva, es decir, son comunes en todos los seres vivos y cambian en el tiempo. Es por eso que las diferencias en cada secuencia, ya sea de nucleótidos o de aminoácidos, reflejan la distancia evolutiva existente entre organismos. Y es esta idea la que se ha venido utilizando por décadas para establecer las relaciones filogenéticas entre los seres vivos.²⁵

El ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas. Permitieron establecer las divisiones mayoritarias y subdivisiones dentro del reino procariota: *Eubacteria* y *Archaeobacteria*. Desde entonces el ARNr 16S se utilizó ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas dentro del mundo procariota. Causando un profundo impacto en nuestra visión de la evolución y, como consecuencia, en la clasificación e identificación bacteriana. Inicialmente, la identificación bacteriana basada en el análisis de las secuencias se hallaba limitada a determinados centros o laboratorios. En la actualidad, y como consecuencia de la automatización y simplificación del proceso, estas técnicas se han introducido en un mayor número de laboratorios.²⁶

El ARNr 16S es un polirribonucleótido codificado con el gen *rrs* o ADN ribosómico ARNr 16S (ADN 16S) incluida en la subunidad 30 S del ribosoma bacteriano. De la misma forma que el ARNr 18S en eucariotas, ambos representan la subunidad pequeña ARNr. Presenta un alto grado de conservación, y se caracteriza por la presencia de regiones

variables especie-específicas. Las mutaciones en otros genes son mejor toleradas que en el ARNr 16S al afectar a estructuras no tan esenciales y únicas como él.²⁷

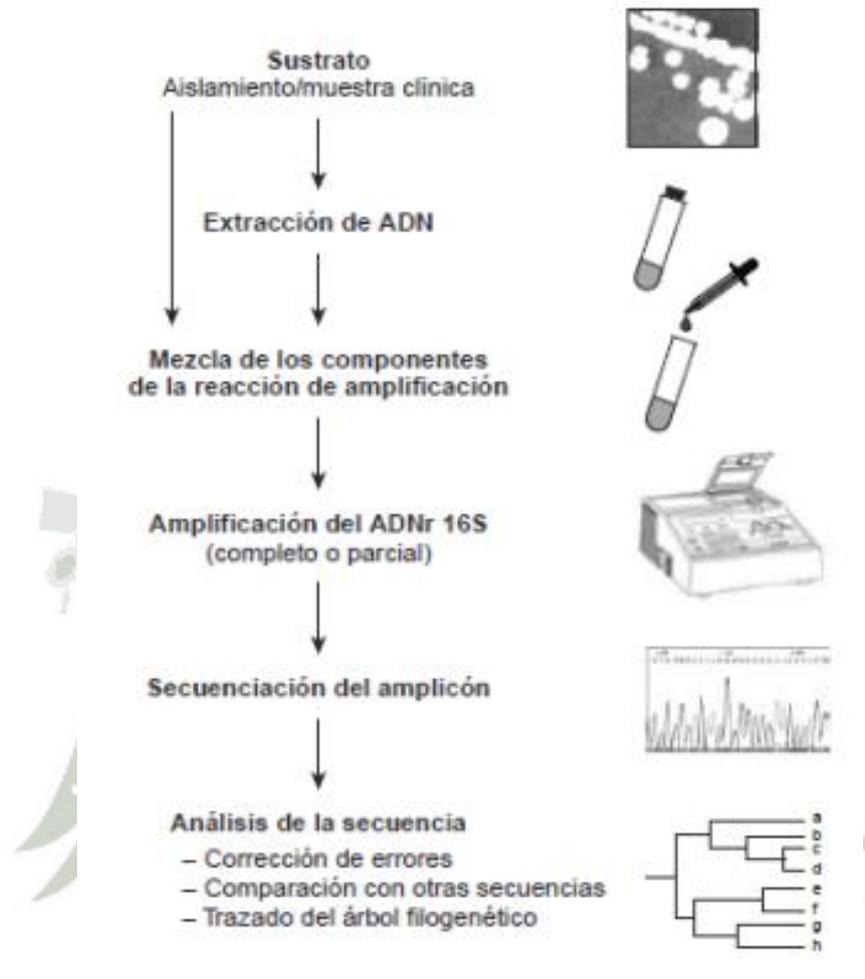


Figura2: Etapas del proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación de ADNr 16S.²²

a. Análisis de secuencias

La observación del electroferograma, la secuencia de bases ofrecidas por los secuenciadores, es el primer paso del análisis de las secuencias, ya que pueden presentarse algunos errores entre el electroferograma y la secuencia; en particular en las posiciones ambiguas, las cuales son marcadas con una letra N. Usualmente este error puede ser reeditado visualmente y corregido. Pero únicamente aquellas

secuencias cuyo error no supere el 1% de la secuencia pueden ser consideradas para este proceso, caso contrario la prueba debe ser repetida.²⁶

En el análisis del ARNr 16S, puede permanecer en cierto grado constante entre una familia, género o especie, por lo que el objetivo es detectar la variabilidad intragénica o micro heterogeneidad. La secuencia se introduce en una base de datos que se encuentra en la nube electrónica o web, que puede ser de acceso público o limitado, con el objetivo de identificar la cepa problema mediante la comparación con otras secuencias depositadas en la base de datos. Actualmente la base publica con mayor cantidad de secuencias y la que consecuentemente es consultada con mayor frecuencia es el Genbank *NCBI National Center for Biotechnology Information*, con programas como BLAST, para el alineamiento de secuencias.²⁷

Después de la introducción de la secuencia problema y su proceso de comparación con todas disponibles en la base de datos, se obtiene información de una Tabla de similitud ordenada a continuación. En la primera sección aparece un gráfico que indica el nivel y el tamaño de los fragmentos alineados, seguido de un listado en orden decreciente de las secuencias de microorganismos con los que se muestra la identidad o porcentaje de coincidencia. Existen criterios para la interpretación de los resultados. Una similitud mayor a 98% define una especie, mientras que valores que se encuentra entre 95% y 99% de similitud definen un género.²³

2.1.3. PIGMENTOS Y COLORANTES

Los pigmentos son compuestos que absorben la luz en una determinada longitud de onda, dejando pasar el resto de esta energía, que es lo que el cerebro interpreta como color. Estos compuestos poseen un cromóforo, que es la parte de la molécula que tiene la capacidad de emitir color. Estos compuestos están ampliamente distribuidos en la naturaleza; se encuentran en toda clase de organismos: plantas, en la piel y los ojos y en otras estructuras animales, y en bacterias hongos. Los compuestos coloreados pueden ser pigmentos o colorantes. Los colorantes están unidos químicamente a una estructura, como los textiles; mientras que los pigmentos necesitan de un compuesto adicional para fijarse.²⁸

Casi todos los tintes o colorantes son materiales orgánicos, en cambio la mayoría de pigmentos eran inorgánicos; a su vez los colorantes orgánicos pueden transformarse en pigmentos uniéndolos a un sustrato sólido, como tiza o arcilla de caolín, y el material resultante podía ser utilizado de la misma forma que los pigmentos inorgánicos. Para servir como “pintura”, los pigmentos son mezclados con un agente “vehículo”, o solvente y un agente como mordiente. El propósito del solvente es hacer la mezcla fluida hasta su aplicación, después de la cual se evapora. Las tizas contienen el pigmento y su compuesto de unión pero no solvente.²⁷

2.1.3.1. Pigmentos naturales

A pesar de que tanto los pigmentos naturales como los sintéticos son utilizados en la actualidad en la industria, los pigmentos naturales representan una mejor alternativa por sus características y propiedades, por lo que pueden ser utilizados en diferentes aplicaciones.

Por ejemplo; las clorofilas presentes en las plantas, son vitales para el proceso de fotosíntesis; y los compuestos con anillos pirrólicos como la hemoglobina y la mioglobina, permiten el transporte de oxígeno en la sangre en los organismos superiores; además, tanto las melaninas fúngicas como otros pigmentos bacterianos son conocidos por sus actividades farmacológicas como antibióticos, en enfermedades como el cáncer y enfermedades cardiovasculares.²⁸ Los pigmentos naturales son clasificados bajo varios criterios, pero en este apartado trataremos cuatro:

A. Por su origen:

Pueden ser divididos en naturales, sintéticos e inorgánicos. Los pigmentos naturales son producidos por organismos vivos como plantas, animales y microorganismos. En cambio, los pigmentos sintéticos son obtenidos a partir de reacciones químicas en laboratorios; finalmente los pigmentos inorgánicos pueden ser encontrados en la naturaleza o reproducidos por síntesis química.²⁹

B. Por la estructura química de su cromóforo

El cromóforo es la parte de la molécula que absorbe y deja para la energía, existen diversos tipos de cromóforos: los que se encuentran conjugados en sistemas como los

carotenoides, antocianinas, betalaínas y pigmentos sintéticos así como las porfirinas; como la mioglobina, clorofila y sus derivados.²⁸

2.1.3.2. Ensayo FT-IR

Los primeros equipos comerciales aparecieron a mediados del siglo XX, habiéndose impulsado su desarrollo durante la Segunda Guerra Mundial, cuando se utilizó para la síntesis de caucho sintético (empleado en el control de la concentración y pureza del butadieno empleado en la síntesis del polímero).³⁰

En la última década del siglo XX aparecieron en el mercado los espectrómetros de transformada de Fourier, ampliando las posibilidades de esta técnica. (ver Espectrofotómetro de transformada de Fourier). La porción infrarroja del espectro electromagnético se divide en tres regiones; el infrarrojo cercano, medio y lejano, así nombrados por su relación con el espectro visible. El infrarrojo lejano (aproximadamente 400-10 cm^{-1}) se encuentra adyacente a la región de microondas, posee una baja energía y puede ser usado en espectroscopia rotacional. El infrarrojo medio (aproximadamente 4000-400 cm^{-1}) puede ser usado para estudiar las vibraciones fundamentales y la estructura rotacional vibracional, mientras que el infrarrojo cercano (14000-4000 cm^{-1}) puede excitar sobretonos o vibraciones armónicas.³¹

La espectroscopia infrarroja se basa en el hecho de que las moléculas tienen frecuencias a las cuales rotan y vibran, es decir, los movimientos de rotación y vibración moleculares tienen niveles de energía discretos (modos normales vibracionales). Las frecuencias resonantes o frecuencias vibracionales son determinadas por la forma de las superficies de energía potencial molecular, las masas de los átomos y, eventualmente por el acoplamiento vibrónico asociado. Para que un modo vibracional en una molécula sea activa al IR, debe estar asociada con cambios en el dipolo permanente. En particular, en las aproximaciones de Born-Oppenheimer y armónicas, i.e. cuando el Hamiltoniano molecular correspondiente al estado electrónico puede ser aproximado por un oscilador armónico en la vecindad de la geometría molecular de equilibrio, las frecuencias resonantes son determinadas por los modos normales correspondientes a la superficie de energía potencial del estado electrónico de la molécula. Sin embargo, las frecuencias resonantes pueden estar en una primera aproximación relacionadas con la fuerza del enlace, y la masa de los átomos a cada

lado del mismo. Así, la frecuencia de las vibraciones pueden ser asociadas con un tipo particular de enlace.³²

Las moléculas diatómicas simples tienen solamente un enlace, el cual se puede estirar. Moléculas más complejas pueden tener muchos enlaces, y las vibraciones pueden ser conjugadas, llevando a absorciones en el infrarrojo a frecuencias características que pueden relacionarse a grupos químicos. Los átomos en un grupo CH₂, encontrado comúnmente en compuestos orgánicos pueden vibrar de seis formas distintas, estiramientos simétricos y asimétricos, flexiones simétricas y asimétricas en el plano (scissoring o tijereteo y rocking o balanceo, respectivamente), y flexiones simétricas y asimétricas fuera del plano (wagging o aleteo y twisting o torsión, respectivamente)³⁰

Para medir una muestra, un rayo de luz infrarroja atraviesa la muestra. Cuando la frecuencia de excitación de un enlace (o grupo de enlaces) coincide con alguna de las frecuencias incluidas en las ondas componentes del rayo, se produce absorción.

Lo que se va a registrar es la cantidad de energía absorbida en cada longitud de onda. Esto puede lograrse escaneando el espectro con un rayo monocromático, el cual cambia de longitud de onda a través del tiempo, o usando una transformada de Fourier para medir todas las longitudes de onda a la vez. A partir de esto, se puede trazar un espectro de transmitancia o absorbancia, el cual muestra a cuales longitudes de onda la muestra absorbe el IR, y permite una interpretación de qué enlaces están presentes.³¹

Esta técnica funciona exclusivamente con enlaces covalentes, y como tal es de gran utilidad en química orgánica. Espectros nítidos se obtienen de muestras con pocos enlaces activos al IR y altos niveles de pureza. Estructuras moleculares más complejas llevan a más bandas de absorción y a un espectro más complejo. Sin embargo esta técnica se ha podido utilizar para la caracterización de mezclas muy complejas. En investigación, la espectroscopía de infrarrojo puede brindar información acerca de los grupos funcionales de moléculas de estructura desconocida. La espectroscopia infrarroja es ampliamente usada en investigación y en la industria como una simple y confiable práctica para realizar mediciones, control de calidad y mediciones dinámicas.³⁰

Los instrumentos son en la actualidad pequeños y pueden transportarse fácilmente, incluso en su uso para ensayos en terreno. Con una tecnología de filtración y manipulación de resultados en agua, las muestras en solución pueden ser medidas con precisión (el agua

produce una absorbancia amplia a lo largo del rango de interés, volviendo al espectro ilegible sin este tratamiento computacional). Algunas máquinas indican automáticamente cuál es la sustancia que está siendo medida a partir de miles de espectros de referencia almacenados.³¹

Al medir a una frecuencia específica a lo largo del tiempo, se pueden medir cambios en el carácter o la cantidad de un enlace particular. Esto es especialmente útil para medir el grado de polimerización en la manufactura de polímeros. Las máquinas modernas de investigación pueden tomar mediciones infrarrojas a lo largo de todo el rango de interés con una frecuencia de hasta 32 veces por segundo. Esto puede realizarse mientras se realizan mediciones simultáneas usando otras técnicas. Esto hace que la observación de reacciones químicas y procesos sea más rápida y precisa.³²

2.1.4. RELACIÓN ENTRE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS Y EL DESARROLLO Y CRECIMIENTO BACTERIANO

2.1.4.1. Pigmentos a partir de *Streptomyces*

Existen varios trabajos alrededor del mundo que evidencian la presencia producción y estudio de pigmentos como metabolitos secundarios, los cuales son en su mayoría expulsados del organismo o difundidos al medio de cultivo. Así tenemos ejemplos de compuesto identificados y no identificados. Uno de los primeros en conocerse fue la actinorhodina, un pigmento que varía su color de rojo a azul dependiendo del pH. Este pigmento fue descubierto en una cepa de *Streptomyces coelicolor* junto con otros análogos estructurales. Posteriormente diferentes cepas de la misma especie presentaron la producción de mayormente actinorhodina, tanto intracelular como extracelularmente.²⁰

También se han encontrado bacterias pertenecientes a esta especie, como el *Streptomyces purpurascens*, en producir análogos de la rodomicina, perteneciente a la antraciclinas, los cuales son ampliamente estudiados en *Streptomyces* debido su intenso color que varía desde amarillo, hasta rojo, azul y violeta; además estos compuestos han ganado la atención de científicos debido a su alta capacidad antibiótica y antitumoral.³²

En este campo se destacan los actinomicetos que habitan el lecho marino, encontrando pigmentos cito tóxicos con diferente potencia y sensibilidad que varían desde el amarillo, al rojo y azul, además se han encontrado pigmentos en nuevas especies de *Streptomyces*, aislados en Vietnam y Chin^{33, 24} ambos pigmentos de color azul y liberados al medio de cultivo.

Otra característica importante de estas bacterias en la producción de pigmentos es su capacidad de producir melanina. Los compuestos de melanina son polímeros irregulares de coloración marrón, que pueden ser producidos por varios microorganismos por fermentación oxidativa. La enzima que actúa principalmente en su producción es la tirosinasa y, para su producción, es necesaria la presencia de tirosina en el medio de cultivo. Este compuesto era principalmente utilizado como un método de identificación y clasificación de las especies de *Streptomyces*³⁵, pero estudios recientes les dan un nuevo enfoque. La melanina posee diferentes funciones biológicas, posee actividad antioxidante³⁶, también se ha propuesto su uso para la tinción de telas y uso en la industria textil, en contraparte con pigmentos sintéticos, los cuales presentan desventajas en la salud y al medio ambiente, tanto en su producción como en su manipulación.

2.1.4.2. Influencia de las condiciones de crecimiento establecidas y la producción de metabolitos secundarios

Los investigadores, en la búsqueda de la producción de metabolitos secundarios, desarrollan técnicas de producción las cuales obedecen a ciertas condiciones de cultivo, condiciones que llegan a conocerse por medio de la experimentación y búsqueda bibliográfica. Así, estas condiciones se denominan condiciones óptimas de crecimiento y son útiles para obtener una mayor biomasa, o producción de metabolitos secundarios, que son la finalidad de la investigación.³⁷

Esta técnica de estudio es relativamente nueva, en nuestro trabajo se ha realizado una exhaustiva búsqueda bibliográfica en relación a la investigación de condiciones óptimas de cultivo en otros microorganismos, y se para la obtención de biomasa o para la obtención de productos de interés científico.³⁸

Los factores que influyen en la pigmentación son variados y no se encuentran bien estudiados. Principalmente, su síntesis e intensidad están afectadas por las condiciones de

crecimiento a tal punto, que ciertos pigmento se observan mejor o únicamente en cultivos sólidos. De esta manera, la producción de pigmentos a partir de microorganismos está íntimamente relacionada con la composición de medio de cultivo, factores como la ausencia o presencia de fuentes de carbono o nitrógeno entre otras.⁴¹

De esta forma, se podría establecer una relación directa entre la producción de pigmento con el crecimiento de la bacteria; si se permite el crecimiento adecuado y la diferenciación del micelio secundario en la cepa nativa de *Streptomyces*, la producción de pigmento se verá incrementada al alcanzar la fase estacionaria con mayor facilidad. Bajo estas características un menor tiempo de diferenciación es necesario e importante para una mayor producción de pigmento por parte de la bacteria, ya que posee mayor cantidad de nutrientes y tiempo de vida para poder producirlo, a diferencia de otros medios en los cuales, la batería podría presentar una obstrucción en su crecimiento y diferenciación.⁴² Es por esta razón que se resalta nuevamente la diferencia entre el crecimiento en un medio sólido y un medio líquido, ya que el segundo la formación del primer micelio se ve prolongada, no permitiendo la adecuada formación del segundo micelio y tampoco permitiendo una óptima producción de metabolitos secundarios; sin embargo, no existe suficiente información en la literatura que pueda sustentar esta idea, por lo que el trabajo se centra en establecer la relación entre el crecimiento y la producción de pigmento en la cepa de *Streptomyces* en particular.⁴⁰



CAPÍTULO III

3.1. MARCO OPERACIONAL

3.1.1. TIPO Y DISEÑO DE ESTUDIO

Es una investigación de laboratorio, ya que las muestras a ser estudiadas son llevadas fuera del campo de estudio para su análisis.

La presente investigación es relacional y se sustenta en el estudio de la influencia del crecimiento óptimo de la bacteria nativa de *Streptomyces spp.* (Variable Independiente) y el rendimiento de la producción del pigmento por dicha bacteria (Variable Dependiente). Los factores manipulados son las condiciones de cultivo pH, Temperatura, concentración de Extracto de Malta y concentración de Extracto de Tierra.

Otra dimensión importante del que hace empleo el presente estudio es la dimensión temporal. El presente es un estudio de corte transversal porque las variables se miden en un solo momento.

Nuestra investigación busca elucidar las relaciones el crecimiento de la bacteria, expresada y la producción de pigmento natural por la misma. Las medidas utilizadas para ambas variables se definen como peso seco por litro de medio de cultivo.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. MATERIALES

3.2.1.1. Material de estudio

El material biológico a utilizar son: las muestras de tierra obtenidas del manantial “Ojo del Milagro”.

3.2.1.2. Materiales de laboratorio, equipos reactivos y medios de cultivo

Equipos

- Incubadora J. P. Selecta
- Autoclave
- Centrifuga Hettich EBA 20
- Balanza analítica: Adventurer Analítica, HAUS
- Vortex, Scientific Industries, Vortex- Genie 2
- Cocina
- Refrigeradora BOSH
- Microscopio óptico Primo Star, ZEISS
- Baño María J. P. Selecta
- Estufa J. P. Selecta

Material de vidrio

- Mortero de porcelana de 250 mL, Boeco
- Placas Petri estériles de plástico o vidrio
- Asa de Digralsky
- Tubos Eppendorf estériles
- Tubos de ensayo; Pirex
- Micropipeta de 1 mL
- Pipeta Pasteur
- Probeta de 50 mL, Boeco
- Matraz 100 mL, 250 mL, Boeco
- Pipeta de 1mL, 10 mL
- Tubos Eppendorf
- Bagueta
- Portaobjetos
- Cubreobjetos

Material anexo

- Guantes de latex
- Pala pequeña de metal
- 3 frascos de plástico
- 1 recipiente termo-aislante
- Asa de siembra
- Cintas indicadoras de pH
- Gradilla
- Discos de papel filtro de poro grueso
- Papel Kraft
- Espátula

Reactivos

- | | |
|--|---------------------------------|
| • Agua destilada | • Caseína hidrolizada, Difco QP |
| • Almidón soluble, Difco | • K_2HPO_4 , Difco QP |
| • Agar TSI, Difco | • KNO_3 , Difco QP |
| • Agar KIA, Difco | • $CaCO_3$ Difco QP |
| • Agar LIA, Difco | • $FeSO_4 * 7 H_2O$, Difco PA |
| • Agar citrato de Simmons, Difco | • $MgSO_4 * 7H_2O$ Difco PA |
| • Agar SIM, Difco | • $CuSO_4 * 5H_2O$ Difco PA |
| • Agar Urea, Difco | • $MnCl_2 * 4H_2O$ Difco PA |
| • Reactivos para la tinción Gram:
Cristal violeta, Solución alcohol-
acetona, Safranina, Lugol | • $ZnSO_4 * 7H_2O$ Difco PA |
| • Extracto de tierra | • Agar-agar, Difco |
| • Extracto de malta | • Tritón 100X, MD |
| • Nitrato de potasio, Difco QP | • Agua ultra pura |
| • NaOH, HCl 0.1N, Difco QP | • Dextrosa, GM |
| • NaOH, HCl 5N, Difco QP | • Avena semi-preparada |
| | • Glicerol |
| | • K_2HPO_4 (anhidro) Difco PA |

- Tirosina
- Asparragina
- NaCl
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
- Arabinosa
- Sacarosa
- Acetona
- Manitol
- Rafinosa
- Inositol
- Fructosa
- Glucosa
- Ramnosa
- Silica gel
- Diclorometano
- Metanol

3.2.2. AMBIENTES DE TRABAJO:

- Laboratorios H-301 y H-302 de la Universidad Católica de Santa María
- Ambiente de trabajo del Laboratorio ADN Uchumayo
- Manantial “Ojo del Milagro”, Characato-Arequipa.

3.2.3. MÉTODOS

3.2.3.1. Toma de muestra

Se tomaron muestras de tierra de campos de cultivo de la región en el distrito de Sabandía, de la región Arequipa. A una profundidad de 20 cm de suelo, se tomaron muestras al azar de entre 9 cuadrantes, con una pala pequeña y fueron colocadas en frascos estériles, se utilizaron guantes de Latex para la protección de las muestras y para evitar la contaminación cruzada; los frascos se almacenaron en un recipiente aislante a 5 °C para el traslado hasta el laboratorio.⁴⁴

3.2.3.2. Tratamiento de la muestra

Una vez transferidas, las muestras fueron secadas en una estufa a 60°C por 1 hora. Una vez secas las muestras de suelo, se tomó un gramo y se mezcló en un mortero con 0.1 gramos de CaCO_3 , esta mezcla se colocó en una placa Petri y se llevó a incubación por 4 días a 37 °C, para mantener la humedad constante en el interior de la placa Petri, se colocaron discos de papel filtro empapados en agua destilada en la placa contraria a la de la muestra.⁴⁴

3.2.3.3. Aislamiento primario de Actinomicetos

Un gramo de cada muestra de suelo pre-tratado y ya incubado se esparció en 10 mL de agua destilada, luego 1 mL de esta solución fue diluida a su vez hasta llegar a una concentración de 10^{-3} y 10^{-5} , y seguidamente se tomó 1 mL y se sembró y esparció con un hisopo quirúrgico estéril o con un asa de Digralsky en la placa con medio de cultivo. Los medios de cultivo a utilizar fueron el medio de almidón-caseína descrito por Shirling y Gottlieb (1966) y suplementado con 10 ug/mL de Fluconazol para inhibir el crecimiento de hongos, se cultivó a 37°C de 4 a 7 días.⁴

Después del crecimiento de bacterias se tomaron datos de bacterias que obedezcan las características morfológicas macroscópicas más representativas del genero *Streptomyces*. Las cuáles serán seleccionadas para el aislamiento secundario.

3.2.3.4. Aislamiento secundario

Las bacterias que produzcan pigmento serán separadas. Con un asa de bacteriológica de punta se tomó una muestra de la colonia deseada y se disolvió en un mililitro de agua ultra pura en un tubo Eppendorf, el cual se sembró en una placa de cultivo nueva, de medio ZSSE⁴³, con ayuda de un hisopo estéril o un asa de Digralsky, previamente esterilizada con etanol y fuego. Las placas fueron incubadas a 37°C por 4 a 7 días. Para la purificación se tomó parte del cultivo, al producir esporas, y se sembró en otra placa, con un asa de siembra por extensión. Se repitió el procedimiento hasta que la cepa se encontró completamente pura, se reservó en el refrigerador para realizar las siguientes evaluaciones.⁴⁴

3.2.3.5. Caracterización microbiológica de la cepa *Streptomyces*

Para la caracterización por el método del ISP, se realizó la siembra de la bacteria purificada en los agares denominados, todos con una copia para igualdad de resultados. La siembra se realizó por agotamiento; para mejores resultados, se esperó que las placas de purificación de la bacteria a caracterizar generaran esporas para sembrar las esporas únicamente. Se incubaron las placas a 37°C por 4 a 7 días. Se tomaron fotografías para observar los resultados.⁴

3.2.3.6. Caracterización bioquímica

Para realizar los medios de cultivo descritos, se disolvió medio necesario para 20mL De agua destilada, los cuales fueron disueltos en matraces de 50 mL Se controla el pH y se distribuyó en tubos de ensayo con rosca. Se llevó a autoclavar y se colocó en forma echada para generar el pico del medio cuando se gelificara dependiendo del tipo de agar que se esté trabajando. Tanto el LIA, TSI, KIA, Citrato de Simmons y Urea, necesitan un pico en el agar, mientras que el SIM no lo necesita. ⁴

Para realizar la tinción Gram, se fijó una azada de la bacteria en un portaobjetos limpio, con alcohol o al calor, luego se agregó cristal violeta hasta cubrir el portaobjetos por 1 a 2 min. Se desechó el exceso de cristal violeta y se enjuagó con agua destilada, se agregó lugol por 1 min. Se desechó el lugol y se agregó la solución de alcohol-acetona por 30 segundos. Se desechó el alcohol acetona y se agregó la safranina por 30 segundos. Se desechó la safranina y se dejó secar. Se observó la placa al microscopio óptico en una aumento de 10X y 40X.⁴⁴

3.2.3.7. Caracterización e identificación molecular

- **Preparación de las cepas de *Streptomyces***

Previamente al proceso de purificación de la muestra para la extracción de ADN, se preparó como mínimo 6 placas con medio de cultivo ZSSE modificado, que sirvió para realizar los repiques necesarios, para la purificación de la bacteria. Se tomó una azada o muestra de la bacteria previamente aislada y se dispersó en un Eppendorf que contiene una solución de tritón al 10 %, el pellet de bacteria se dispersó con ayuda de un Vortex a mínima velocidad hasta su completa desaparición, luego se sembró en una de las pacas de cultivo utilizando un hisopo estéril o asa de Digralsky y se incubó a 37°C por 7 días.

Después del crecimiento se tomó una azada de esta muestra y volvió a sembrarse e otra placa, sucesivamente hasta obtener al menos 6 repiques de la misma bacteria. El último repique fue llevado para realizar la extracción de ADN correspondiente.

- **Extracción de ADN, amplificación y secuenciación**

El proceso de extracción de ADN, amplificación por PCR fueron realizados en los laboratorios de ADN Uchumayo, para la extracción de ADN se utilizó el método

convencional de extracción con fenol: cloroformo. Se tomó una asada de bacterias a partir de la placa repicada anteriormente y se disolvió en 500 uL De buffer de lisis, dentro de un tubo Eppendorf, se llevó al Vórtex hasta la completa disolución del pellet por 2 horas. Luego se añadió 500 uL de la Solución de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico y se colocó en el Termomixer a 25°C durante 10 minutos. Se centrifugó a velocidad máxima durante 5 minutos y se transfirió la fase acuosa a otro tubo Eppendorf.

Se añadió isopropanol puro frío y se mezcló suavemente, luego se centrifugó a máxima velocidad por 5 minutos. A la formación de un pellet se descartó el sobrenadante y se secaron los tubos en forma invertida, finalmente se resuspendió el ADN con 10 uL de agua ultrapura para la electroforesis y PCR correspondientes. Las muestras amplificadas de PCR fueron enviadas al Laboratorio de Análisis de la Universidad de Harvard, en resguardo de los laboratorios ADN Uchumayo. La secuenciación fue realizada por los laboratorios de análisis de la Universidad de Harvard.⁴⁵

- **Estudio de la secuencia y generación del árbol filogenético**

Los resultados enviados de la secuenciación llegaron como data virtual en un programa 'Eb1' el cual fue abierto y estudiado en comparación con otra base de datos virtual la cual posee la misma información de otras bacterias similares o iguales. Se realizó una búsqueda en la base de datos utilizando la herramienta BLAST, para encontrar las cepas de bacterias más similares a la secuencia obtenida. Luego, utilizando la herramienta CLUSTAW se realizó un árbol filogenético con las 8 a 10 primeras bacterias que presenten una mayor similitud con la secuencia obtenida.

3.2.3.8. Extracción del pigmento

Para la evaluación de la producción de pigmento en el proceso de crecimiento de la bacteria *Streptomyces*, se detuvo el crecimiento de cada una de las placas a su hora respectiva, después de tomar el peso de la placa se procedió a la extracción del pigmento. Para la extracción de pigmento, se tomó el agar de las placas de cultivo y se colocó en una solución de acetona y agua a un pH de 10, regulado con una solución de NaOH 5 N. Colocar la solución en la estufa a 47°C por 24 horas. Se filtró con una gasa y quedarse con el filtrado, que contiene el pigmento en modo líquido. Se centrifugó en tubos Falcón de 15

mL de capacidad y a una velocidad de 5800 rpm por 10 minutos. Se descartó el precipitado y el sobrenadante se llevó a otro tubo en el cual se agregó HCl 5N para pasar a un pH de 3, en el cual el pigmento empieza a precipitar, se agitó el tubo cerrado para acelerar el proceso de precipitación y se centrifugo a 5800 rpm durante 15 minutos; se descartó el sobrenadante y el pigmento precipitado se llevó a secar a la estufa a una temperatura de 47°C. Para la purificación primaria, se tomó el pigmento seco y se disolvió en acetona a un 90% de pureza, se movió hasta que el pigmento se liberó del almidón restante, dejando un precipitado de color blanco. ⁴⁴

Se dejó precipitar y se obtuvo el sobrenadante, el cual se concentró en el rotavapor y se llevó a una columna de cromatografía con silica gel, con una combinación de metanol – diclorometano en una relación de 4:6. El pigmento purificado obtenido es separado y nuevamente secado en estufa a 47°C. Para determinar el rendimiento en cada etapa de crecimiento cada placa fue colocada por separado en la primera solución de acetona, y cada extracto fue separado para su peso individual. ⁴⁴

3.2.3.9. Determinación de óptimos de crecimiento en medio líquido

- **Evaluación de óptimos de extracto de tierra en medio líquido**

Para la preparación de los medios, se distribuyeron en 4 tubos las concentraciones de extracto de tierra y extracto de malta mostradas en la Tabla No. 1; se llevó a autoclavar dentro de los tubos de ensayo y se sembraron con un asa de siembra de la placa purificada de la bacteria. Se incubó a 37°C durante 7 días.

Tabla1: Componentes de los medios para evaluar % de extracto de tierra.

% Extracto de tierra	mL para 10 mL (tubo de ensayo)	% Extracto de malta	mL para 10 mL (tubo de ensayo)	mL de agua estilada.
25	2.5	40	4.0	3.5
30	3.0	40	4.0	3.0
40	4.0	40	4.0	2.0
50	5.0	40	4.0	1.0

Para la determinación de crecimiento, se consideró el peso del micelio, se dejó precipitar la biomasa y se retiró el agua con una pipeta Pasteur y se llevó el sedimento a secar en una estufa a 40°C. Luego se pesaron los resultados, se preparó un tubo adicional como blanco para el contenido de sólidos del medio de cultivo.

- **Evaluación de óptimo de extracto de malta en medio líquido**

Para la preparación de los medios, se distribuyeron en 4 tubos las concentraciones de extracto de tierra y extracto de malta en la Tabla No. 2; se llevó a autoclavar dentro de los tubos de ensayo y se sembraron con un asa de siembra de la placa purificada de la bacteria. Se incubó a 37°C durante 7 días.

Tabla2: Componentes de los medios para evaluar % de extracto de malta.

% Extracto de tierra	mL para 10 mL (tubo ensayo)	% Extracto de malta	mL para 10 mL (tubo ensayo)	mL de agua de estilada.
40	4.0	25	2.5	3.5
40	4.0	30	3.0	3.0
40	4.0	40	4.0	2.0
40	4.0	50	5.0	1.0

Para la determinación de crecimiento, se consideró el peso del micelio, se dejó asentar la biomasa y se retiró el agua con una pipeta Pasteur y se llevó el sedimento a secar en una estufa a 40°C. Luego se pesaron los resultados, se preparó un tubo adicional como blanco para el contenido de sólidos del medio de cultivo.

- **Evaluación de óptimo de temperatura en medio líquido**

Para la evaluación del valor de temperatura óptima de crecimiento, se evaluaron 5 temperaturas diferentes, justificadas de acuerdo a bibliografía: 20°C, 28°C, 36°C, 44°C, 52°C.⁴⁵ El medio utilizado será el medio ZSSE modificado, el cual fue desarrollado con un 40% de extracto de malta y 40% de extracto de tierra. En 5 tubos se colocó inóculo, una asada de cultivo de la placa de *Streptomyces* purificada, luego se colocaron en un baño

María los tubos y se incubaron por una hora, luego se llevaron a incubar a 37°C por 4 a 7 días.

Para la determinación de crecimiento, se consideró el peso del micelio, se dejó asentar la biomasa y se retiró el agua con una pipeta Pasteur y se llevó el sedimento a secar en una estufa a 40°C. Luego se pesaron los resultados, se preparó un tubo adicional como blanco para el contenido de sólidos del medio de cultivo.

- **Evaluación de óptimo de pH en medio líquido**

Para la evaluación de valor de pH óptimo de crecimiento, se evaluaron 5 tubos con diferentes valores de pH: 5, 6, 7, 8, y 9. El medio utilizado fue el medio ZSSE modificado, con un 40% de extracto de tierra y un 40% de extracto de malta. El pH fue modificado en los tubos con medio de cultivo antes de ser esterilizados. El inóculo se agregó después de que fueron enfriados y se llevó a incubación a 37°C por 4 a 7 días.

Para la determinación de crecimiento, se consideró el peso del micelio, se dejó asentar la biomasa y se retiró el agua con una pipeta Pasteur y se llevó el sedimento a secar en una estufa a 40°C. Luego se pesaron los resultados, se preparó un tubo adicional como blanco para el contenido de sólidos del medio de cultivo.⁴⁴

3.2.3.10. Determinación de la cinética microbiana en medio líquido

Para la incubación, se utilizó el medio ZSSE modificado en la proporción óptima de 40% extracto de tierra, 40% extracto de malta. Se preparó 50 mL de medio a un pH de 7 y se esterilizó antes de preparar el inóculo. Se tomó una azada de la placa con la bacteria y se sembró en el matraz con el medio estéril. Se colocó en la incubadora a 37°C. Se tomó muestras de 3 mL con la pipeta de 1 mL en horas marcadas: 0, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96 y 120 horas, cada muestra fue colocada en dos tubos Eppendorf y congelada, se tomaron muestras por duplicado.⁴⁷

Una vez pasadas todas las horas y tomadas todas las muestras, se procedió a descongelar y a leer al espectrofotómetro a una longitud de onda de 580 nm; se procedió también a secar las muestras de los Eppendorf en la estufa a una temperatura de 40°C, se tomaron los pesos como peso de biomasa, se tomó también el peso del medio únicamente como blanco.

3.2.3.11. Determinación de la cinética microbiana en medio sólido

Para la evaluación de la cinética microbiana en medio sólido, se prepararon placas del medio ZSSE modificado, con los porcentajes de crecimiento óptimo, se tomaron los pesos iniciales de cada una de las placas de cultivo, previamente escritas con cada hora. Se determinó un diámetro para las placas y se sembró por agotamiento a partir de la placa pura de bacteria. Como la evaluación de cinética de crecimiento en medio líquido, se determinaron las horas de toma de muestra, cada placa de cultivo se colocó en una refrigeradora para interrumpir el crecimiento. Luego se pesaron en una balanza para determinar la diferencia de pesos obtenida conforme a l crecimiento. Se tomaron tres repeticiones de pesos en la balanza y se obtuvo el promedio con el cual se realizó la cinética de crecimiento. ⁴⁶

3.2.3.12. Determinación de óptimos de producción en medio sólido

Para la preparación de los medios e cultivo, se utilizaron las mismas proporciones de extracto de malta y extracto de tierra descritas en anexos. Agregando una concentración de 20 gramos por litro a cada uno de los medios, se esterilizaron y distribuyeron en placas Petri. Después de enfriar, se tomó una azada del medio de cultivo y se sembró con un diámetro definido como las placas de estudio de la cinética microbiana. Se cultivó a 37°C por 4 días. Se llevó a congelar para destruir a las bacterias y el micelio y se procedió a la purificación del pigmento, método desarrollado en la sección de purificación. El pigmento obtenido por separada de cada uno de los tubos Eppendorf y se secó el pigmento precipitado en una estufa a 40°C. Se pesó los tubos en a balanza analítica, teniendo un tubo Eppendorf completamente seco como blanco de estudio. ⁴⁴

3.2.3.13. Determinación de óptimos de temperatura para la producción de pigmentos

Para la evaluación de diferencia de temperatura, se prepararon placas a misma concentración optima de extracto de malta y extracto de tierra, se prepararon placas Petri de cultivo a un pH 7 y se prepararon 5 tubos con los respetivo valores de temperatura descritos en la evaluación en medio líquido, se sembró en tos tubos y se incubo por 1 hora en el baño María, se tomó 1 mL De cada tubo y con ayuda de un hisopo estéril se sembró en las placas de cultivo. Se incubo a 37°C por 4 días. Se llevó las placas a congelar y luego se procedió a purificar el pigmento con el método correspondiente. Se colocó el pigmento

de cada placa en tubos Eppendorf y se llevó a secar a una estufa a 40°C. Se pesó los tubos en a balanza analítica, teniendo un tubo Eppendorf completamente seco como blanco de estudio.

3.2.3.14. Determinación de óptimos de pH para la producción de pigmentos

Para la evaluación de diferencia de pH, se prepararon placas a misma concentración optima de extracto de malta y extracto de tierra, se prepararon placas Petri de cultivo a un pH 7 y se prepararon 5 tubos con los respetivo valores de pH descritos en la evaluación en medio líquido, se sembró en tos tubos y se incubo por 1 día en las condiciones de pH, se tomó 1 mL De cada tubo y con ayuda de un hisopoestéril se sembró en las placas de cultivo. Se incubó a 37°C por 4 días. Se llevó las placas a congelar y luego se procedió a purificar el pigmento con el método correspondiente. Se colocó el pigmento de cada placa en tubos Eppendorf y se llevó a secar a una estufa a 40°C. Se pesó los tubos en la balanza analítica, teniendo un tubo Eppendorf completamente seco como blanco de estudio.⁴⁴

3.2.4. CARACTERIZACIÓN DEL PIGMENTO

3.2.4.1. Ensayo de cambio de pH

Para los ensayos de actividad de pH, se tomó 2 mL de una solución 1:10 del pigmento purificado y se colocó en tres tubos, en el primer tubo se modificó el pH a un valor de 1 con una solución de HCl 5N, en el segundo tubo se mantuvo un pH de 7 y en el tercer tubo se llevó a un pH de 12 con una solución de NaOH 5 N. Se anotó el cambio de color presente y que color de cambio se obtenía.⁴⁴

3.2.4.2. Ensayo FT-IR

Para el ensayo FT-IR, se tomó 1 gramo del pigmento purificado y se solubilizó en 10 mL de acetona pura, esta muestra se selló y se llevó a analizar en el laboratorio de química analítica USAQ de la universidad Mayor de San Marcos en Lima. Se obtuvo el espectro IR que se comparó con estudios y bibliografía en los cuales se estudia la producción de pigmentos a partir de este género. Los resultados de los otros procesos de análisis como el cambio de color en diferentes valores de pH y solubilidad en diferentes solventes orgánicos.⁴

3.2.4.3. Pruebas de actividad de pigmento

- **Prueba de citotoxicidad en linfocitos humanos**

Para la evaluación de linfocitos humanos, se utilizaron los métodos necesarios: la extracción de linfocitos de sangre, utilizando el método de gradiente de Ficoll; y el método de evaluación de citotoxicidad por incubación.

- **Obtención de linfocitos humanos por gradiente de Ficoll**

Para la evaluación con gradiente de Ficoll, se obtuvo 5 mL de sangre con una jeringa, os cuales se colocaron en un tubo estéril con cristales de EDTA para prevenir la coagulación, os cuales se disolvieron en una solución estéril de PBS pH 7,2 y se mezcló suavemente para lograr su completa disolución y se mantuvieron a 37°C para la preparación de a gradiente en la cual se utilizó una solución de Ficoll-Hypaque ya preparada, provista por MERK. Se tomó 2 mL De Ficoll y se colocaron en un tubo Falcón de 15 mL De capacidad, luego con ayuda de una Micropipeta de 1000 microlitros, se colocaron 8 m de sangre diluida con PBS por las paredes y con cuidado de formar dos fases completamente marcadas. Se colocó el tubo Eppendorf en la centrifugar y se centrifugó a una velocidad de 2500 por 15 minutos. Se retiró el tubo y con una Micropipeta de 20 micro litros se retiró la fase blanquecina encontrada entre la fase amarilla que contiene el sero y el Ficoll, esta fase, que contenía los linfocitos, se tomó una muestra de 10 ul y se llevó a conteo de células a una cámara new Bauer para determinar la cantidad de linfocitos por el que se tenía en presente, se reservó en un tubo Eppendorf estéril y se mantuvo a 37°C para la evaluación de citotoxicidad.⁴⁷

- **Evaluación de citotoxicidad del pigmento en linfocitos humanos**

Se prepararon cuatro concentraciones de pigmento para la evaluación: 0.5, 0.75, 1 y 2 mg/mL, y se colocó 200 ul en tubos Eppendorf con una melca de suero PBS y acetona en una proporción de 7:3. Además se preparó una solución blanco de buffer PBS, una solución negativa de buffer PBS-acetona a la misma concentración anterior y una solución positiva con una solución de peróxido de hidrogeno a 0.6 mg/mL Los tubos fueron llevados a baño María hasta adquirir una temperatura de 37°C, luego se tomaron 50 ul del

tubo estil con los linfocitos y llevando a cada tubo Eppendorf as concentraciones de pigmento por triplicado y se llevó a incubar a baño María o incubadora por 1 hora. Luego de este tiempo se hizo el conteo de viabilidad celular de cada uno de los tubos para determinar el número de muertes obtenidas en cada ensayo.⁴⁷

- **Determinación de la viabilidad celular**

Para la determinación de la viabilidad celular se tomó 10 ul de cada solución a evaluar y se convino con 10 ul de una solución de azul de tripán al 0.16% en PBS, estas dos sustancias se mezclaron en un tubo de ensayo

- **Prueba de capacidad antioxidante usando el método FRP**

Para realizar la prueba de FRP se preparó previamente la solución tampón de acetato y se verifico su pH con cintas de pH y un potenciómetro, para la preparación del reactivo FRP, se prepararon soluciones de $K_3Fe(CN)_6$ 0.3 μ mol/L, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 20 μ mol /L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 mmol/L. la solución de trabajo se realizó momentos antes de realizar el ensayo FRP. La cual consistió en 1,5 de $FeCl_3$ y 1,0 mL de solución de $K_3Fe(CN)_6$ con 15 mL de tampón acetato pH 3,6 precalentado previamente a 37°C.⁴⁷

Para el ensayo se prepararon tres muestra de pigmento a la misma concentración, 1 mg/L, una muestra negativa con 1 mL de agua destilada estéril y una muestra patrón realizada con la solución de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ luego se añadió 2 mL de la solución FRP en cada frasco y se dejó en reposo en una cámara de oscuridad por 1 hora. Pasado el tiempo de incubación, se registró el cambio de coloración a amarillo claro, en un fondo blanco.⁴⁷

- **Prueba de capacidad antimicrobiana en *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli***

- a. **Preparación de medios de cultivo**

Para la evaluación de actividad antimicrobiana, se utilizaron dos métodos. El medio que se utilizo fue agar nutritivo, en el primer método, se preparó el agar combinando la cantidad necesaria descrita en el empaque para 200 mL Los cuales se disolvieron en agua destilada y se calentó para su completa disolución, luego se llevó a autoclavar; se enfrió hasta alcanzar una temperatura a aproximada de 40 °C y se agregó un inculo de cada una de las dos bacterias a estudiar: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. Se movió para combinar el medio con la bacteria y se

procedió a plaquear antes de que el agar se gelifique completamente, una vez distribuido en las diez placas Petri, se dejó gelificar para la preparación y colocación de discos antibióticos.

Para el segundo método de siembra, se preparó 100 mL de agar nutritivo, que fue calentado y auto clavado con misma condiciones que el método anterior, pero en vez de enfriarlo y agregar el inóculo, se distribuyó en las placas Petri y se llevó a gelificar, luego se tomó 1 mL de inóculo y fue esparcido con hisopos estériles encima de toda la placa, a partir de este paso se reservó para la preparación y colocación de discos antibióticos.

b. Preparación de discos antibióticos

Para la preparación de discos antibióticos, se tomó papel filtro y se cortó en pequeños círculos de no más de medio centímetro de diámetro. Los cuales se cortaron en un frasco y se llevaron a autoclavar. Se prepararon las mezclas de los dos antibióticos: Penicilina y Lincomicina. Se preparó una solución de pigmento a una concentración de 10 mg/mL. Se tomaron los discos auto clavados y se sumergieron en las soluciones, se colocó formando un círculo separación para cada placa, colocando un disco de cada antibiótico, más las repeticiones del pigmento. Se realizaron las placas por duplicado, sembradas con los dos métodos de siembra, por cada microorganismo, se llevó a incubar a 37°C por 24 horas y se anotaron resultados. Se anotó la formación de un halo marcado en medio de la placa como inhibición de crecimiento positiva.

CAPÍTULO IV

4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Presentaremos en primer lugar una descripción de la primera variable, la cepa nativa de *Streptomyces*, su caracterización bioquímica y molecular, luego haremos lo propio con la segunda variable que es el pigmento producido por esta bacteria, para finalmente ocuparnos del tamaño de la interacción entre ambas variables de estudio, ante los factores de pH, temperatura, concentración de extracto de tierra y concentración de extracto de malta. Los detalles respecto a estas secciones serán explicados y analizados en la parte correspondiente a la discusión en el presente informe de investigación. En el presente trabajo se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson.

4.2.1. TOMA Y TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

4.2.1.1. Toma de muestra

El hábitat natural del género *Streptomyces* es el suelo, para propósito de este trabajo, se tomaron tres muestras de tierra del manantial “Ojo del Milagro”, ubicado en el distrito de Characato, en la ciudad de Arequipa. En la Tabla No. 3 se presenta la localización geográfica de las tres muestras tomadas, denominadas como muestra A, muestra B y muestra C.

Tabla3: Lugar de toma de muestra de tierra.

Lugar de toma de muestra	Manantial “Ojo del Milagro”- Characato, Arequipa Peru.	
Muestra	Latitud	Longitud
Muestra A	16° 28' 7,12 “ Sur	71° 27' 27,29” Oeste
Muestra B	Latitud 16° 28' 7.72” Sur	71° 27' 26.46” Oeste
Muestra C	Latitud 16° 28' 8,72” Sur	71° 27' 28,74” Oeste

Se tomaron muestras de tierra de una profundidad de 20 cm desde la capa superior del suelo, para evitar la contaminación por el movimiento de la capa de suelo que se encuentra en contacto con el aire, se obtuvo una muestra de un volumen de 10 gramos, y colocados en frascos opacos de plástico estériles, y guardadas a una temperatura de 4 °C en su traslado hacia el laboratorio. Las muestras fueron tomadas con una pala, y guantes para evitar contaminaciones. En la Tabla No. 4 se observa los lugares de recolección de las muestras de tierra, los cuales tienen la característica en común de poseer un suelo fértil y húmedo, con un ligero olor a tierra húmeda.⁴³

Tabla4: Características de la zona de toma de muestra

Muestra A: Lecho de manantial	Muestra B: Campo de cultivo de maíz	Muestra C: Campo de alfalfa
		

Para el trabajo realizado, el muestreo fue sencillo, no se tomó en cuenta el análisis de las características químicas y composición del suelo con minuciosidad, como es en los casos de estudio de contaminación de suelos, se tomaron muestras de tierra de una profundidad de 20 cm desde la capa superior del suelo, para evitar las contaminación por el movimiento de la capa de suelo que se encuentra en contacto con el aire.⁴²

Dentro de las características específicas de los *Streptomyces* y otros Actinomicetos, presentan un olor típico a suelo húmedo por la producción de un metabolito llamado geosmina, este olor característico es encontrado mayormente en suelos los cuales tiene

buena humedad o son fértiles y adecuados para el cultivo y crecimiento de plantas. Es por esta razón que se tomó muestras de zonas húmedas y zonas de sembrío como el lecho de río y la tierra de cultivo.

Finalmente, en la Tabla No 5. Se anotan las características organolépticas de cada una de las muestras, en las cuales se anotó el olor, color, textura y humedad. La muestra A y C mostraron características favorables para el crecimiento de actinomicetos y otros microorganismos, sin embargo, fue la muestra B, perteneciente al campo de cultivo de maíz, que mostro un olor fuerte a tierra húmeda, correspondiente a metabolitos como la geosmina, característicos del genero *Streptomyces*.

Tabla5: Características organolépticas de las muestras obtenidas

Muestra	Textura	Color	Olor	Humedad
A	Heterogénea	Marrón Oscuro	Sin olor	Poca
B	Mixta	Marrón Oscuro	Terroso	Buena
C	Heterogénea	Marrón Oscuro	Terroso	Buena

4.2.1.2.Tratamiento de la muestra

En el tratamiento de la muestra, se tomó 0.1 gramos de carbonato de calcio y se homogeneizo junto con las tierras de tratamiento, para este tratamiento, se realizó cámaras de humedad con papel filtro previamente mojado en agua y pacas Petri de plástico, las cuales se muestran en la Figura 3, la ventaja de estas placas frente a las de vidrio fue una mejor distribución y más rápida absorción del calor que produjo paulatinamente humedad suficiente para realizar el experimento. ⁴⁴

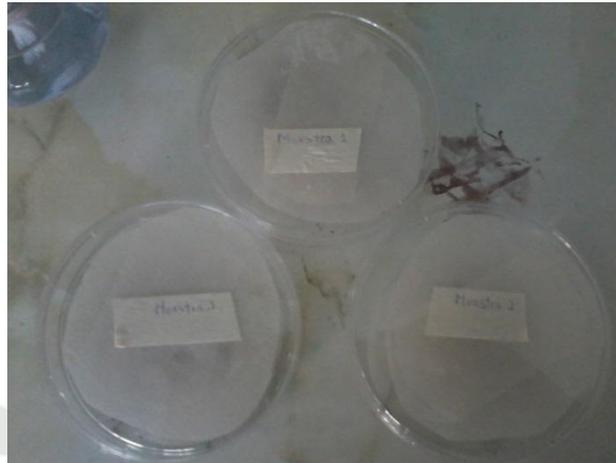


Figura3: Cámaras de humedad en las cuales se colocaron las tres muestras de tierra previamente tratadas con carbonato de calcio

Antes de proceder al aislamiento enfocado específicamente para actinomicetos el cual consiste en la preparación de las muestras de tierra para el aislamiento específico de actinomicetos, uno de los primeros métodos usados para aislarlos probado en trabajos anteriores, que han mostrado buenos resultados.

El tratamiento con carbonato de calcio permite la separación de la superficie de la bacteria de la superficie química y orgánica del suelo, para su mejor aislamiento. El método fue modificado en el presente trabajo a falta de una cámara de humedad, la cual se realizó de manera empírica con placas Petri estériles y papel filtro estéril empapado en agua destilada, el calor constante pero no excesivo permite una transformación paulatina del agua presente en el papel filtro en vapor que se condensa a llegar a la parte superior de la placa, y regresa al papel filtro, repitiéndose el proceso.³¹

4.2.2. AISLAMIENTO PRIMARIO

Una vez tratadas, las muestras de tierra fueron diluidas en agua estéril para su siembra en el medio inicial de aislamiento. Se utilizó el medio de almidón - caseína agar. En la Tabla No. 6 se presenta las características básicas para escoger a las colonias que pueden pertenecer al género *Streptomyces*, y en la Figura 4 se observan dos de las colonias escogidas.

Tabla6: Análisis fenotípico y macroscópico de tres bacterias obtenidas en las muestras de tierra que concuerden con las características generales de un *Streptomyces*.

Características morfológicas	2.1.B	2.2.B	2.1.C
Morfología de las esporas	circulares	ovaladas	ovaladas
color de esporas	gris	gris	gris
superficie de la espora	suave	suave	aterciopelado
color del micelio aéreo	gris	blanco	gris
textura del micelio aéreo	rugoso	rugoso	rugoso
color del micelio reverso	amarillo	amarillo	gris
Tinción Gram	positiva	positiva	positiva
pigmento difusible	-----	amarillo	-----

Para el aislamiento de la bacteria de *Streptomyces* se procede a la metodología básica de conteo de microorganismos en análisis de suelos el cual sugiere un medio, si necesario, específico para la separación de microorganismos específicos que desean ser encontrados. Justificando la utilización inicial del medio almidón -caseína, encontrado en trabajos de aislamiento de *Streptomyces*, este género es capaz de consumir sustratos complejos como única fuente de carbono, este medio de cultivo, junto con el medio Gausse, han probado ser eficaces para el aislamiento de cepas de Actinomicetos; además se agregó al medio un anti fúngico, para la inhibición del crecimiento de los hongos, ya que el crecimiento promedio del género *Streptomyces* se encuentra entre los 4-7 días, en casos de especies determinadas, hasta dos semanas, por lo que la aparición de hongos en la placa de cultivo podría dificultar el aislamiento. El anti fúngico utilizado fue Fluconazol a una concentración de 10 ug/mL

4.2.3. AISLAMIENTO SECUNDARIO

Para el aislamiento secundario se utilizó un medio diferente, el medio ZSSE modificado para su crecimiento, el repique se realizó por agotamiento, la bacteria escogida para el aislamiento secundario fue la perteneciente a la muestra B, la cual presentó producción de pigmento al reverso del micelio una vez alcanzado el crecimiento de su segundo micelio,

de color blanco y aspecto aterciopelado. Es después de esta etapa que la bacteria empieza a generar sus esporas de color gris, que pueden observarse en la Figura 4.a.

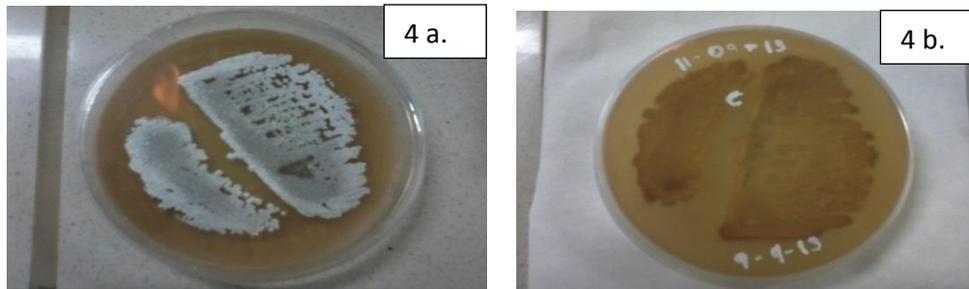


Figura4: Purificación de la bacteria 2.2.B. productora de pigmento de color amarillo – pardo. 4.a. micelio aéreo, 4.b. reverso de la placa de cultivo

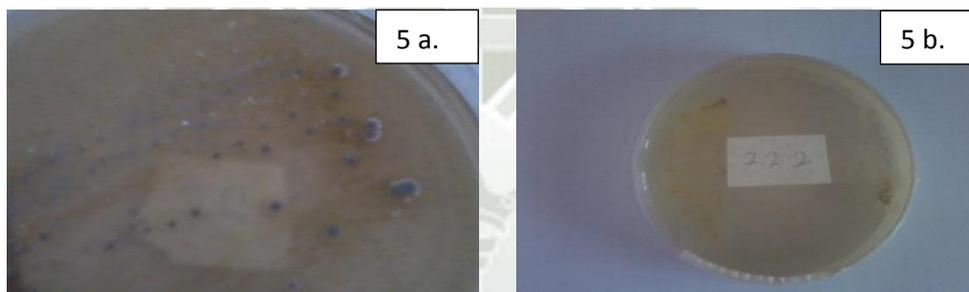


Figura5: Aislamiento primario de la bacteria encontrada en la muestra B, perteneciente al campo de cultivo de maíz. 5.a. primer aislamiento, 5.b. cepa productora de pigmentos

En esta sección se procedió al aislamiento y purificación de la bacteria escogida como 2.2.B. la cual podía producir una cierta cantidad de pigmento difusible al medio se observó que el pigmento difundido aumentó en concentración conforme la bacteria adquirió un estado puro. El crecimiento fue más grande y próspero, su duración de vida fue de aproximadamente una semana antes del agotamiento total del medio y la producción de esporas por parte de la bacteria.

4.2.4. CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LA CEPA *Streptomyces*

4.2.4.1. Caracterización e identificación molecular

Para poder determinar la pertenencia de la bacteria a un grupo específico del género, fue necesario obtener la secuencia del gen ribosomal 16S, para lo que se aisló y amplificó

dicho gen por medio de la extracción de su ADN y la reacción de la PCR. En la Figura 6 se presenta el árbol filogenético, en el cual se compara una serie de bacterias pertenecientes al género *Streptomyces* las cuales guardaban un porcentaje de similitud con la secuencia de nuestra bacteria. En la imagen se puede observar que la similitud no es completa, y que la bacteria no pertenece a una especie estudiada o caracterizada, con la cual pueda ser comparada. Además, en las Figuras 7 y 8 se muestra los pasos que se siguió para la obtención de la secuencia de estudio y las secuencias con las cuales fue comparado, extraídas de una base de datos virtual llamada *Gen Bank*.⁴⁸

En esta sección, la caracterización molecular muestra que la bacteria encontrada no presenta una similitud mayor al 97% en ninguna de las bacterias encontradas en la base de datos NCBI. Esto sugiere que la bacteria obtenida es nueva, y que su semejante más cercano con una taxonomía y especie definidas es la bacteria *S. graminofaciens*.

Para la identificación genética de la bacteria se utilizó la identificación por medio del gen 16S rRNA, el cual se encuentra en todas las bacterias.

Este RNA se encuentra formado los ribosomas de la bacteria, y esta secuencia es única para una bacteria en particular, siendo de esta manera una huella digital, la cual puede ser rastreada y comparada con otras bacterias, la similitud de sus secuencias con la secuencia de búsqueda es la clave para la identificación a bacteria según su género y especie, así mismo para demostrar que una bacteria es nueva o no, lo cual es de gran importancia para la ciencia e investigación científica.⁴⁹

A continuación en la Tabla No. 7 se presenta la secuencia obtenida después del proceso de extracción de ADN, amplificación y secuenciación, información la cual se compara con la base de datos presente en la página electrónica NCBI.

La cepa nativa de *Streptomyces* presenta una similitud con las otras cepas de un máximo del 98%, es decir, que no posee una similitud completa con el resto de las bacterias seleccionadas y por lo tanto puede ser considerada como una bacteria nueva. El árbol filogenético es hecho para determinar la cercanía o semejanza a una especie en particular, para comparar sus datos morfológicos.⁴⁸

Tabla7: Secuencia del gen ribosomal 16S perteneciente a la bacteria nativa de *Streptomyces*

>SECUENCIA de estudio

```
NNNGCATGCGGCNGTGCNTACACATGCAGTCGAACGATGAACCACTTCGGTGG
GGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGG
GACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAACACTGCGGATCGCATGGT
CTGCGGTTGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGT
TGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGC
GACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
GTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAG
GGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTG
ACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCG
GCTTGTACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATT CGA
TACGGGCAGGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTG
AAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCC
ATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTC
GTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAA
GGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTG
GCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATAACGGGA
AGCATCAGAAATGGGTGCCCCCTTTGTGGTTCGGTATACAGGGGGTGCATGGC
TGTCGTCAGCTCGGGTCGGGAGATGTGGGGTAGTCCCGGACGAGCGCAACCTT
GTTCTGGGTTGCAGGCATGCCTTTCGGGGGGGATGGGGACTTCCCCAGAAAAA
TGCCGGGGTCAACTTCGGAGGAA
```

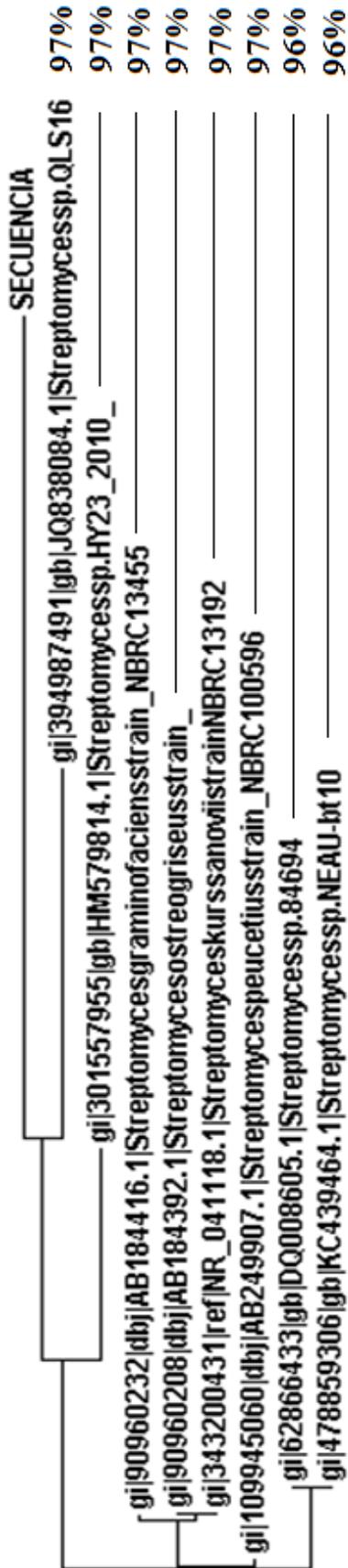


Figura6: Árbol filogenético de la bacteria nativa de *Streptomyces* y las cepas y especies cercanas encontradas por comparación del gen 16 S en la base de datos Gen Bank del NCBI

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
<input type="checkbox"/>	Streptomyces sp. HY23(2010).16S.ribosomal RNA gene, partial sequence	1853	1853	99%	0.0	97%
<input type="checkbox"/>	Streptomyces sp. QLS16.16S.ribosomal RNA gene, partial sequence	1825	1825	99%	0.0	97%
<input type="checkbox"/>	Streptomyces graminofaciens gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC.13455	1908	1908	99%	0.0	97%
<input type="checkbox"/>	Streptomyces graminofaciens 16S rRNA gene, type strain LMG.19892	1905	1905	99%	0.0	97%
<input type="checkbox"/>	Uncultured bacterium clone A-54.16S.ribosomal RNA gene, partial sequence	1903	1903	99%	0.0	97%
<input type="checkbox"/>	Streptomyces ostreogriseus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC.13423	1903	1903	99%	0.0	97%
<input type="checkbox"/>	Streptomyces kurssanovii strain NBRC.13192.16S.ribosomal RNA, partial sequence >dbj AB184325.1 Streptomyces kurssanovii gene for 16S rRNA, partial sequence	1903	1903	99%	0.0	97%
<input type="checkbox"/>	Streptomyces peucetius gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC.100596	1882	1882	99%	0.0	97%
<input type="checkbox"/>	Streptomyces peucetius subsp. caesius gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC.14663	1879	1879	99%	0.0	97%
<input type="checkbox"/>	Streptomyces peucetius subsp. caesius gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC.14662	1879	1879	99%	0.0	97%
<input type="checkbox"/>	Streptomyces peucetius subsp. caesius gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC.14660	1879	1879	99%	0.0	97%
<input type="checkbox"/>	Streptomyces peucetius strain JCM 9920.16S.ribosomal RNA, partial sequence >dbj AB045887.1 Streptomyces peucetius gene for 16S rRNA	1877	1877	99%	0.0	97%
<input type="checkbox"/>	Streptomyces sp. NEAU-b110.16S.ribosomal RNA gene, partial sequence	1860	1860	99%	0.0	96%
<input type="checkbox"/>	Streptomyces sp. 84694.16S.ribosomal RNA gene, partial sequence	1860	1860	99%	0.0	96%

Figura 7: Ilustración del banco de datos de búsqueda Gen Bank del NCBI, en el cual las bacterias que tiene mayor similitud con la secuencia problema de la cepa nativa de *Streptomyces* se presentan en orden decreciente.

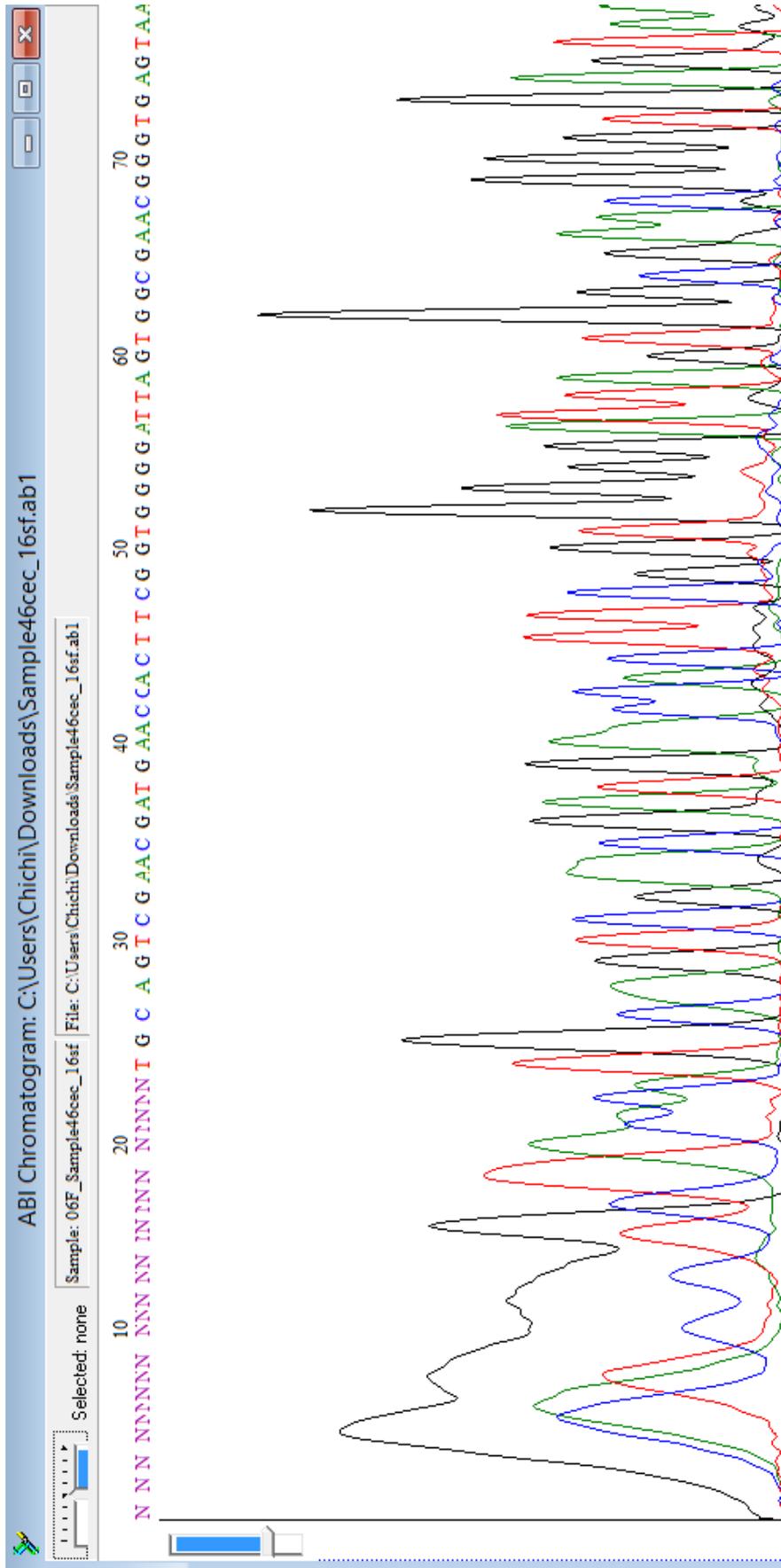


Figura8: Archivo Ab1 enviado por los laboratorios de secuenciación para su análisis y generación de árbol filogenético.

ClustalW2

Formulario de entrada
Servicios web
Ayuda y Documentación
Cuota
Realimentación

Herramientas > Alineación de Secuencia Múltiple > ClustalW2

Alineación de Secuencia Múltiple

ClustalW2 es un ADN objetivo o el programa de alineación de secuencias múltiples de proteínas en general por tres o más secuencias. Para la alineación de dos secuencias favor en lugar de utilizar nuestras herramientas de alineación de secuencias de pares .

Nota: ClustalW2 ya no se mantiene . Por favor, considere el uso de la nueva versión en su lugar: [Clustal Omega](#)

PASO 1 - Introduce las secuencias de entrada

Escriba o pegue un conjunto de ADN secuencias en cualquier apy.ado formato:

```

GGGACTGAGACACGGCCCACTCTACGGGAGGCAGAGTGGGGAATTTGCCAATGGGGGAAAGCCTGATGCACGGACCGCCGTGAGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGGAAGGG
AAAGTGACGGTACCTGCAGAAAGGCGCGGTAACTACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCGGAAATTTGGGGTAAAGAGCTGTAGGGGCTTGTACGTCGGATGTGAAAGCCCG
GGCTTAACCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTGTGGGAGATCGGAATTCCTGGTAGCGGTGAAATCGCGGTAATCAGGAGAACACCCGGTGGCGAAGCCGATCTTGGGCCATTACTG
ACGCTGAGGAGCGAAAGGTTGGGAGCGAAGAGATTAGATACCCGTGTAGTCCACCGGTAAACGTTGGAACTTGGGCAATCCACGATTCGCGGCAATTAAGTCCCGCCCTGGGGA
GTACGGCCGAAGGCTAAACTCAAAGGAAATTCAGGGGCCGCAACAGCGGAGGATGGCTTAATTCGACGCAACCGGAAGACCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGGAAGCATCAGAAATGGGTGCCCC
CTTTGTGGGTATACAGGGGGTGCAATGGCTGTGTCAGCTCGGGTGGGAGATGTGGGAGTGTCCCGGACGAGGGCAACCTTGTCTGGGTTGCAGGGATGCCCTTCCCGGAGACTTCCCGCAGAAAAATG
CCGGGGTCAACTTCGGAGAAJ
                
```

O bien, subir un archivo: Seleccionar archivo Ningún archivo seleccionado

PASO 2 - Establezca sus opciones de alineación por parejas

Alineación Tipo : Lento Rápido

Los ajustes predeterminados se cumplen las necesidades de la mayoría de los usuarios y, por esa razón, no son visibles.

(Haga clic aquí, si desea ver o cambiar la configuración predeterminada.)

Figura 9: Programa CLUSTALW2 utilizado para alinear secuencias múltiples de nucleótidos o proteínas, en el cual se colocó la secuencia de la cepa nativa de *Streptomyces* junto con las cepas encontradas y escogidas en el NCBI-BLAST.

La mayor similitud se encontró con la cepa QLS16, la cual se encontraba mencionada en la base de datos del NCBI, pero no se encontraba mayor información con respecto a su caracterización bioquímica o morfológica, por lo que se fue investigando otras bacterias cuya especie haya sido denominada y caracterizada, por lo que la bacteria nativa de *Streptomyces* con la que se trabaja fue comparada con la especie *graminofaciens*, que presentaba ciertas características morfológicas similares con la bacteria nativa de *Streptomyces* estudiada en el presente trabajo, como su micelio superior, la cual ha reportado ser blanco en algunas ocasiones, pero la mayoría de veces se torna gris, lo cual es una diferencia marcada con la cepa nativa de *Streptomyces*, que tiene siempre un micelio totalmente blanco en su completo desarrollo.⁵⁰

La similitud marcada entre estas dos especies es su micelio reverso, el cual es de color amarillo; sin embargo son las diferencias entre una bacteria y otra lo que comprueba que no son la misma, y que su cercanía no es suficiente como para poder incluir a la bacteria *Streptomyces* nativa de Arequipa dentro de esta especie.

4.2.4.2. Caracterización bioquímica

Después de la respectiva purificación de la bacteria nativa de *Streptomyces* y su caracterización molecular, se procedió a realizar la caracterización bioquímica, la cual estuvo dividida en dos partes, en esta sección se discutirá la caracterización por medio del método ISP, mencionado en secciones anteriores.

Por este método se permite estudiar la morfología macroscópica de la bacteria, observando los cambios de color, textura y crecimiento cuando es expuesta a diferente composición en el medio de cultivo. De esta forma, un crecimiento bueno en comparación a uno muy bueno refiere a la expansión del micelio de la bacteria a través del medio, así como la velocidad con la que este crece.

El método ISP fue creado para notificar las características de los actinomicetos en crecimiento de estos medios, por ejemplo, en el medio de agar tirosina, algunas especies de *Streptomyces* poseen la enzima capaz de degradar la tirosina, llamada tirosinasa en cuyo proceso de degradación produce como metabolito secundario un pigmento de color marrón llamado melanina. Pigmentos como la melanina eran únicamente utilizados como una característica fenotípica para la identificación y caracterización de especies de

Streptomyces, pero estudios recientes demuestran su gran utilidad para el hombre, como antibióticos, anticancerígenos y antioxidantes.⁴

Tabla 8: Análisis de resultados fenotípicos del crecimiento en los medios propuestos por el ISP para caracterización de actinomicetos.

Medios ISP	Crecimiento (G)	micelio aéreo	Reverso	Color de las esporas	Producción de Melanina
ISP 2	Muy bueno	blanco	amarillo	gris	-
ISP 3	Muy bueno	blanco	amarillo	gris	-
ISP 5	bueno	amarillo	amarillo	Gris	-
ISP 7	bueno	Blanco	marrón	gris	+

Para la caracterización, se realizó una siembra por agotamiento, que permite el crecimiento de la bacteria en toda la placa, y permitir absorber los componentes de cada uno de los medios para buenos resultados, también se utilizó las esporas generadas por el micelio secundario de la bacteria, ya que el micelio secundario es bastante resistente y se arraiga con fuerza al medio del cultivo, es más fácil y genera mejores resultados sembrar las esporas para generar un micelio desde el inicio.⁴⁴

Los parámetros utilizados para señalar las características de la *Streptomyces* se encuentran en el compendio Wink, en el cual se trabajan con los mismos parámetros para definir sus características. La placa de cultivo se ve por ambos lados, anotando la forma y el color del micelio, tanto en el lado reverso como el normal, así como las esporas generadas en cada uno de los medios de cultivo, también se anota la formación de pigmentos como melanina otros pigmentos, que también son importantes en la caracterización de los actinomicetos. Gracias a la ayuda del análisis molecular, se pudo comparar la bacteria con la especie *graminofaciens*, que fue comparada con sus características encontradas en el compendio Wink, en el cual se encontró varias similitudes, sin embargo también se encontraron algunas diferencias, pues la bacteria nueva tiene mayor cercanía a otras bacterias de una

especie sin calificar, y de la cual no se tiene mayor información, por eso las diferencias fueron aceptables.⁵⁰

La bacteria, según la tinción Gram, es Gram positiva. Los *Streptomyces* como genero se caracterizan por ser Gram positivas. En la placa también puede observarse la formación del micelio secundario y las esporas que produce. La tinción Gram trabaja de una manera ingeniosa, las bacterias pueden diferenciarse en la composición de su pared celular, así dependiendo de la composición de su pared, la bacteria es capaz de absorber o dejar salir ciertos colorantes como el cristal violeta.⁵¹

4.2.4.3. Características macroscópicas:

Para la evaluación de las características macroscópicas y microscópicas se tomó en cuenta la nomenclatura antes usada en la evaluación por el método ISP, y por la tinción Gram realizada en un frotis en una lámina porta objetos. La cepa nativa de *Streptomyces* presenta colonias puntiformes, rugosas, no mucoides, producción de pigmento amarillo difundido al medio, micelio aéreo color blanco, reverso color amarillo.

Tinción Gram: Gram +

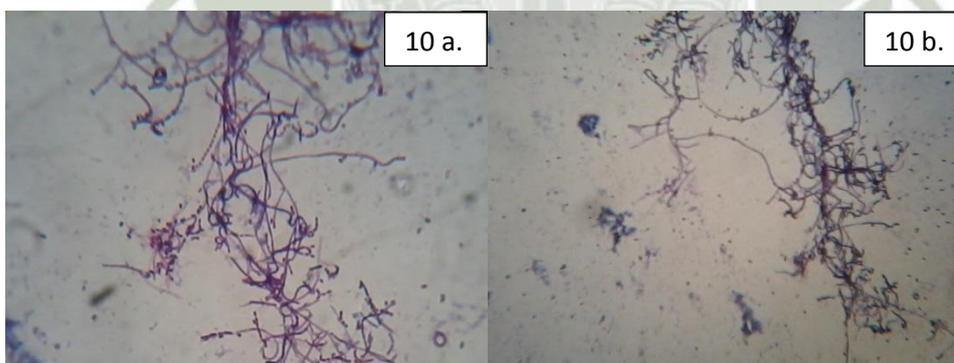


Figura 10: Tinción Gram de la bacteria nativa de *Streptomyces* 2.2.B.

Pruebas bioquímicas

Luego de las pruebas en el método ISP, se realizaron las pruebas bioquímicas las cuales se muestran en la Tabla No. 9. Los medios diferenciales que se utilizan en las pruebas

bioquímicas tienen en su mayoría indicadores que reaccionan a los cambios de pH, generando un color que se traduce en la utilización de una vía metabólica específica. ⁵²

Tabla9: Datos obtenidos de la caracterización bioquímica de la bacteria nativa de *Streptomyces 2.2.B.*

Medio de cultivo	Imagen blanco	Imagen	Resultados
Urea			Degradación de Urea +
TSI			K/K
KIA			K/K
LIA			K/K
SIM			Movilidad negativa.
Citrato de Simmons			Fermentación de Simmons positiva

A continuación de la Tabla No. 9, en la Tabla No. 10, se presenta un resumen de las interpretaciones de los resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas a la cepa nativa de *Streptomyces*, la cual presenta una fermentación de azúcares negativa, capacidad de degradación de urea y citrato.

Tabla10: Resumen de resultados y análisis de la actividad bioquímica de la cepa nativa de *Streptomyces* 2.2.B.

Caracterización bioquímica		
TSI	K/K	Fermentación negativa
LIA	K/K	Fermentación negativa
SIM	NEGATIVO	Movilidad negativa
urea	POSITIVO	Degradación de urea
Citrato de Simmons	POSITIVO	Fermentación de citrato de Simmons
KIA	K/K	Fermentación negativa

En la Tabla N° 10, se resumen los resultados de las pruebas bioquímicas correspondientes a la interpretación de los colores y características observadas. En la evaluación de fermentación de azúcares como es TSI, KIA, LIA fue negativa, la movilidad o presencia de flagelos en la estructura de la bacteria es negativa, la bacteria es capaz de utilizar urea como una fuente de nitrógeno en el medio de cultivo.

Para de análisis de resultados en las pruebas bioquímicas, se tomó como punto de comparación a la especie *Streptomyces* graminofaciens y otras menos cercanas. La familia *Streptomyces* se caracteriza por su amplio rango de uso de sustancias como fuentes de carbono y nitrógeno, teniendo una gran variedad de enzimas que permiten la degradación de las mismas. Esto permite justificar la degradación de urea y citrato como fuente de nitrógeno y carbono, así como el uso de azúcares en los otros medios, que no necesariamente terminan en el cambio de pH, por lo que demuestra que a *Streptomyces* no realiza una fermentación alcohólica. Finalmente, la prueba de movilidad es negativa, debido principalmente a que la *Streptomyces* no posee flagelos que le permitan moverse; por sus similitud al desarrollo fúngico, se esparce por e medio de cultivo al crecer sus hifas y permitir la colonización, y se mueve en el ambiente a través de sus esporas. ⁵²

4.2.5. EXTRACCIÓN DE PIGMENTO

Para poder comprender el rendimiento de producción normal de pigmento y por lo tanto el rendimiento obtenido a condiciones óptimas de crecimiento, se procedió a la extracción y purificación del pigmento. En un primer momento, el pigmento tiene una fijación fuerte a los remanentes de almidón, pero la purificación con acetona permite su separación.

Finalmente se evaluó la producción de pigmento a diferentes horas de crecimiento, generando una curva de producción. En la Tabla 11 se observan los pesos obtenidos de esta producción y seguidamente en la Figura 11 su curva de producción.

Tabla11: Datos de pesos obtenidos de la producción de pigmento en variación del tiempo respecto al crecimiento de la cepa nativa de *Streptomyces* con un tiempo de crecimiento total de 120 horas.

Hora	Peso1	Peso2	Peso3	Promedio	Peso real
0	0.5887	0.5889	0.5884	0.5887	0.0007
4	0.5986	0.5978	0.5977	0.5980	0.0100
8	0.6987	0.6998	0.6984	0.6990	0.1110
16	0.7898	0.7901	0.7899	0.7899	0.2019
24	0.8286	0.8285	0.8286	0.8286	0.2406
48	1.6541	1.6542	1.6538	1.6540	0.4780
96	1.6268	1.6270	1.6270	1.6269	0.4509
120	3.2780	3.2787	3.2784	3.2784	0.9264

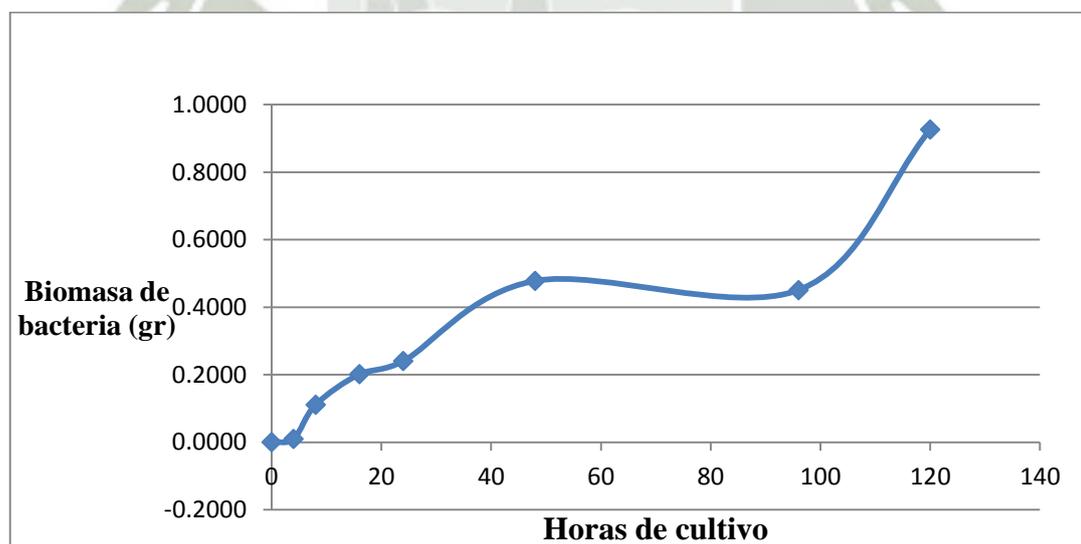


Figura11: Curva de producción o concentración del pigmento en 120 horas de crecimiento.

4.2.6. EVALUACIÓN DE ÓPTIMOS DECRECIMIENTO EN EXTRACTO DE TIERRA

Para la evaluación de crecimiento de la bacteria, se utilizó los valores de crecimiento en medio líquido y sólido, a pesar que estos valores no cambiaron entre sí, únicamente las características morfológicas, es decir, la aparición del segundo micelio; no se evidencio en ningún momento producción de pigmento en el medio líquido, a diferencia del medio sólido, en el cual una vez formado el micelio secundario de color blanco, permitido la formación de tonalidades amarillas a través de toda la placa de cultivo.

A partir de la Tabla 12 y la Figura 12 se observan los pesos obtenidos con los diferentes factores evaluados, así como sus gráficos los cuales demuestran cuales son los valores óptimos. En el presente trabajo, se evaluó cuatro factores importantes, la temperatura, el pH, y las concentraciones de los extractos de tierra y malta que conforman el medio de cultivo. Estos valores al variar en el proceso de crecimiento, son los que determinan el desarrollo, tiempo de desarrollo y producción del pigmento de interés.

Tabla12: Resultados del crecimiento de la bacteria nativa de *Streptomyces* a diferentes factores de pH, temperatura, % de extracto de malta y % de extracto de tierra.

pH	Peso	Peso real	Temperatura	Peso	Peso real
5	0.0539	0.0174	20	0.0522	0.0157
6	0.0612	0.0247	28	0.0523	0.0158
7	0.0615	0.025	36	0.0575	0.021
8	0.0517	0.0152	44	0.0524	0.0159
9	0.0504	0.0139	52	0.0493	0.0128
blanco	0.0365				
% ET	Peso	Peso real	% AA	Peso	Peso real
25	0.0590	0.0225	25	0.0418	0.0053
30	0.0607	0.0242	30	0.0422	0.0057
40	0.0715	0.035	40	0.0476	0.0111
50	0.0696	0.0331	50	0.0479	0.0114

En la Figura N° 12, se presenta un resumen de los gráficos obtenidos por la comparación del crecimiento de la bacteria en diferentes condiciones de cultivo, lo cual demuestra los valores óptimos de crecimiento.

En la evaluación de pH, reportes y características de otras bacterias *Streptomyces*, incluidas *Streptomyces graminofaciens*, presentan un pH óptimo de crecimiento en 7 – 7.8; además varios de los medios de cultivo desarrollados en el ISP sugieren un pH de 7 o y.8, esto se debe a que la mayoría de microorganismos presentan un crecimiento adecuado a un pH 7; aunque existan microorganismos que soporten valores diferentes, la bacteria nativa de *Streptomyces* parece resistir hasta un pH 6, en el cual el valor de peso eco de micelio obtenido en medio líquido, es el más alto, mientras que en los otros valores empieza a decrecer, lo valores establecidos son un rango básico utilizado en otros ensayos de optimización, ya que es necesario probar los limites los cuales a bacteria empieza a morir.

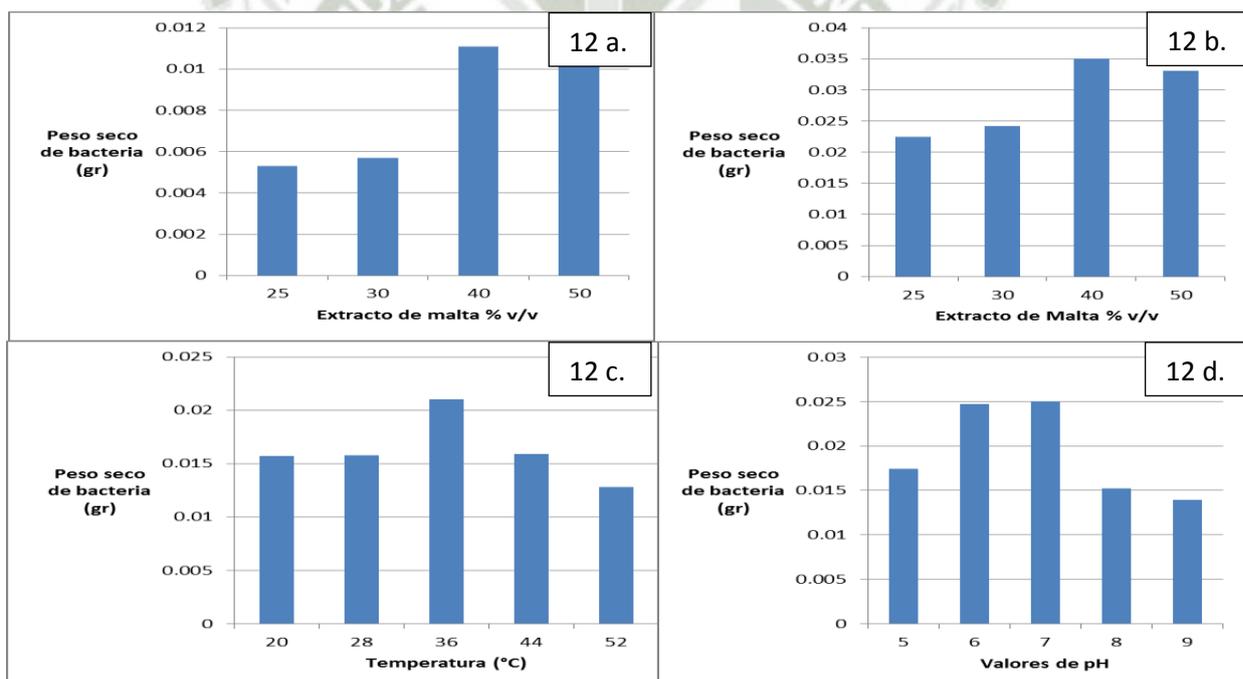


Figura12: Diferencia entre los rendimientos de crecimiento total después de 120 días a los diferentes factores de crecimiento. 12 a. evaluación de pH, 12.b. evaluación de temperatura, 12.c. evaluación de concentración de extracto de tierra, 12.d. evaluación de concentración de extracto de malta.

Es el mismo caso de la evaluación de temperatura, la temperatura 28°C fue obtenida del crecimiento óptimo de la especie *Streptomyces graminofaciens*, mientras que los valores de 20°C y 36°C corresponden a valores normales de bibliografía⁴⁴, en los que la mayoría de hongos y bacterias son capaces de crecer respectivamente. Por último la temperatura de 52°C fue tomada como un límite máximo de temperatura en la que se observa que la mayoría de microorganismos empiezan a morir.⁵¹ Para la evaluación de concentración de extracto de tierra y extracto de malta, el criterio de evaluación es ligeramente diferente. Los microorganismos utilizan los componentes del medio de cultivo para poder desarrollarse, pero existe un límite de concentración de sustrato que ellos pueden utilizar a una determinada velocidad, es decir, que un exceso de sustrato puede no ser utilizado e incluso, inhibir el crecimiento del microorganismo. En el ensayo de extracto de tierra tanto como el extracto de malta se tomó cuatro concentraciones. De las cuales se 40% en ambos casos fue el desarrollo óptimo, ya que a partir de ese valor, el crecimiento se mantiene a un mismo nivel, por lo que el mínimo necesario para un crecimiento óptimo es el 40 %.

4.2.7. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA MICROBIANA EN MEDIO LÍQUIDO

En la Tabla 13 se expresa como peso los datos de micelio obtenido junto con algunos sólidos que pueda pertenecer al medio de cultivo, es en el peso real que se resta esta diferencia con ayuda de un blanco hecho del mismo medio para obtener la diferencia.

Tabla13: pesos del micelio de la bacteria en relación al tiempo de crecimiento en horas, en un total de 120 horas o 5 días.

Hora	Peso	Peso real
0	0.587	0.5282
4	0.61	0.5512
8	0.474	0.4152
16	0.434	0.3752
24	0.613	0.5542
48	1.283	1.2242
96	0.809	0.7502
120	0.749	0.6902

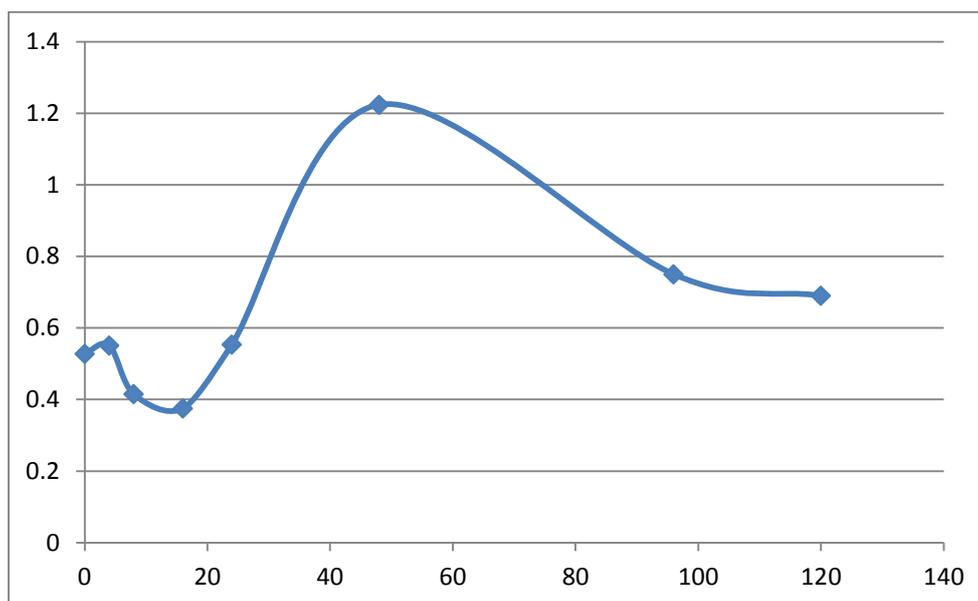


Figura13: Curva de crecimiento o cinética de crecimiento de la bacteria nativa de *Streptomyces 2.2.B.*

En la Figura 13, se presenta una curva de crecimiento de la bacteria en un medio líquido, considerando el peso del micelio obtenido en el proceso de crecimiento, que pasa por un proceso de secado para obtener e peso seco de la misma. La curva tiene una forma exponencial a partir de las 24 horas.

4.2.8. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA MICROBIANA EN MEDIO SÓLIDO

Para la determinación de la cinética microbiana en medio sólido, la metodología en comparación al método líquido es muy similar, en la Tabla 14 se observa que se tomaron tres pesos por cada muestra de los cuales se obtuvo finalmente un promedio y se restó nuevamente de un blanco, que en este caso es el mismo tiempo cero.

En la Figura 14 se presenta la curva de crecimiento de la bacteria en un medio sólido, esta presenta un crecimiento exponencial en menos tiempo a comparación del crecimiento en medio líquido, siendo el inicio de un crecimiento exponencial a las 12 horas.

Tabla14: Peso del micelio y del crecimiento de la cepa nativa de *Streptomyces*

Hora	Peso 1	Peso 2	Peso 3	Promedio	Peso real
0	28.7714	28.7699	28.7684	28.7699	
PI	31.1025	31.1493	31.1335	31.1284	0.0000
4	24.8985	24.8977	24.8973	24.8978	
PI	26.8985	26.8977	26.8973	26.8978	0.3585
8	25.7619	25.7630	25.7595	25.7615	
PI	27.2132	27.2120	27.2113	27.2122	0.9078
16	25.5137	25.4886	25.4667	25.4897	
PI	26.2171	26.2199	26.2206	26.2192	1.6290
24	29.5071	29.5072	29.5070	29.5071	
PI	30.1884	30.1859	30.1851	30.1865	1.6791
48	26.6389	26.6383	26.6383	26.6385	
PI	26.5998	26.5968	26.5965	26.5977	2.3993
96	32.0922	32.0905	32.0895	32.0907	
PI	33.1563	33.1537	33.1519	33.1540	1.2953
120	36.3968	36.3954	36.3951	36.3958	
PI	37.7601	37.7571	37.7594	37.7589	0.9954

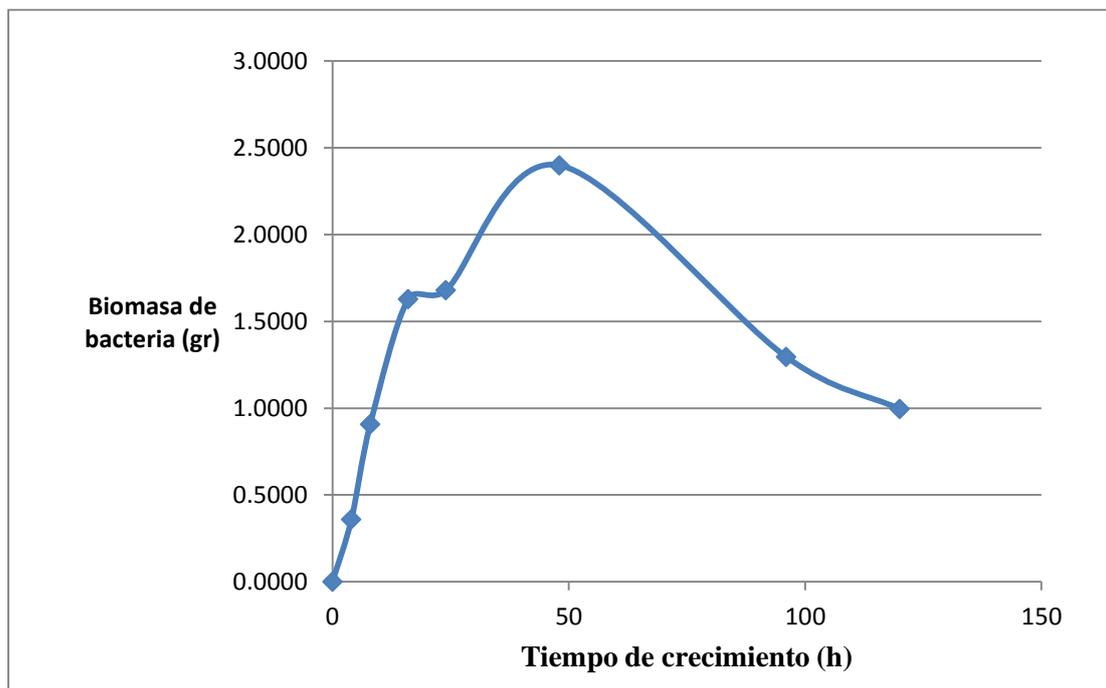


Figura14: Curva de crecimiento y cinética de la cepa nativa de *Streptomyces* en un medio sólido.

4.2.9. DETERMINACIÓN DE ÓPTIMOS DE PRODUCCIÓN EN MEDIO SÓLIDO

A diferencia del medio líquido, en el medio sólido se pudieron obtener valores de pigmento los cuales pudieron medirse para la evaluación de sus valores óptimos de producción. Tal y como en la evaluación de la cinética en medio sólido discutida anteriormente, se tomaron tres pesos de la muestra de los cuales se obtuvo el peso promedio y el real. La

Tabla 15 y la Figura 15 nos muestran estos datos a evaluación. Para más adelante en otra sección analizar su correlación con los valores obtenidos en el crecimiento. Se midieron tres pesos de los cuales se obtuvo su promedio y se restó del valor blanco que corresponde al peso de los sólidos presentes en el mismo medio de cultivo.

Tabla15: datos de la determinación de producción de pigmentos en gramos, a diferentes factores de crecimiento aplicados a la cinética de la bacteria nativa de *Streptomyces*.

Ext.	Peso1	Peso2	Peso3	Promedio	Peso real
Malta					
25%	0.8171	0.8182	0.8181	0.8178	0.2298
30%	0.815	0.8191	0.8151	0.8164	0.2284
40%	0.8954	0.8952	0.8941	0.8949	0.3069
50%	0.8954	0.8925	0.8895	0.8925	0.3045
Tierra					
Ext.	Peso1	Peso2	Peso3	Promedio	Peso real
25%	0.8021	0.8027	0.8030	0.8026	0.2146
30%	0.8372	0.8378	0.8380	0.8377	0.2497
40%	0.8375	0.8345	0.8305	0.8342	0.2462
50%	0.8303	0.8307	0.8313	0.8308	0.2428
	5	0.4596	Temperatura	20	0.2299
	6	0.4408		28	0.2094
pH	7	0.9026		36	0.5402
	8	0.6707		44	0.4574
	9	0.3884		52	0.2533

En la Figura 15 se presenta la comparación de la producción de pigmento a las diferentes condiciones de cultivo mostradas con anterioridad para el crecimiento óptimo de la bacteria.

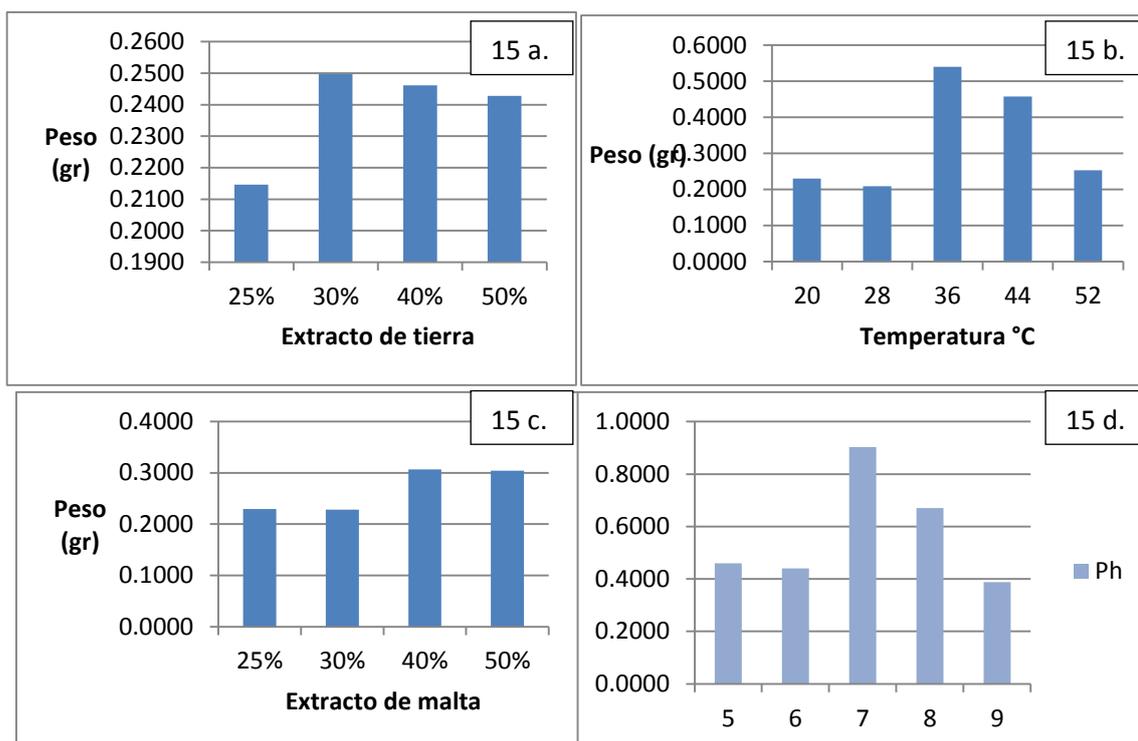


Figura15: Diagrama de producción de pigmento a diferentes valores de pH (15d.), temperatura (15 b.), % de extracto de malta (15 c.) y % de extracto de tierra.(15 a.)

4.2.10. CARACTERIZACIÓN DEL PIGMENTO

4.2.10.1. Ensayo de cambio de pH

En la Tabla N° 16 se presentan los cambios de color del pigmento naturalmente de color amarillo, purificado y obtenido de la bacteria nativa de *Streptomyces*, el pigmento se queda en el rango de color amarillo que posee y cambia sutilmente de intensidad al alcanzar rangos de pH extremos como pH 2 o pH 13.

Tabla16: Ensayo de cambio de pH para el pigmento producido por la bacteria nativa de *Streptomyces*

pH	2	7	13
Color	Amarillo Claro	Amarillo Intenso	Pardo

4.2.10.2. Ensayo FT-IR

La caracterización del pigmento se puede dividir en dos partes: la primera en la que se evalúan las características básicas del pigmento y la evaluación de su posible utilidad. Para la caracterización del pigmento se evaluó su capacidad de cambio de color frente a condiciones extremas de pH. Descrito varias veces en trabajos anteriores con la búsqueda de un pigmento en particular, una melanina, se encontró que el pigmento pierde color en un medio ácido y este color se intensifica en un medio altamente básico, el pigmento que se encontró en la cepa nativa de *Streptomyces* era de color amarillo intenso se tornó casi incoloro y pardo oscuro respectivamente.⁵²

Para el análisis de su estructura, se realizó un ensayo FT-IR en el cual se define los grupos funcionales presentes en la estructura del pigmento. El espectro presenta picos a 3358.07, el cual puede ser un enlace –OH (hidroxilo) o grupos de aminas secundarias, otro pico que caracteriza a grupos amino se encuentra a 1693.50 cm^{-1} mientras que se percibe un pico a 1637.50 cm^{-1} ; los cuales son característicos para grupos C=O (carbonilo) y doble enlace de carbono, respectivamente.

Otros trabajos anteriores sugieren estos mismos grupos en sus espectros IR para pigmentos como melaninas^{50,54}, pigmentos usualmente de colores amarillos a pardos que tienen variadas y complejas estructuras, los cuales presentan en su mayoría enlaces determinantes como los antes mencionados.⁵²

La estructura básica de una melanina, en particular las eumelaninas, es un monómero conocido como DHI, o 5,6-dihidroxiindol, y en su forma oxidada DHICA, 5,6-dihidroxiindol-2-acido carboxílico.⁵⁵ Esta estructura posee un grupo indol, el cual está conformado con un anillo aromático y un pirrol; los indoles son componentes capaces de dar color, y se encuentran no únicamente en las melaninas, también en otros pigmentos naturales como los flavonoides. Presentes en el reino vegetal. Este monómero es capaz de unirse a otras estructuras como proteínas y aminoácidos. Sin embargo, el pigmento de la cepa nativa de *Streptomyces spp.* Comparte otras características que pueden ser comparables con otros pigmentos producidos por el mismo género.⁵⁶

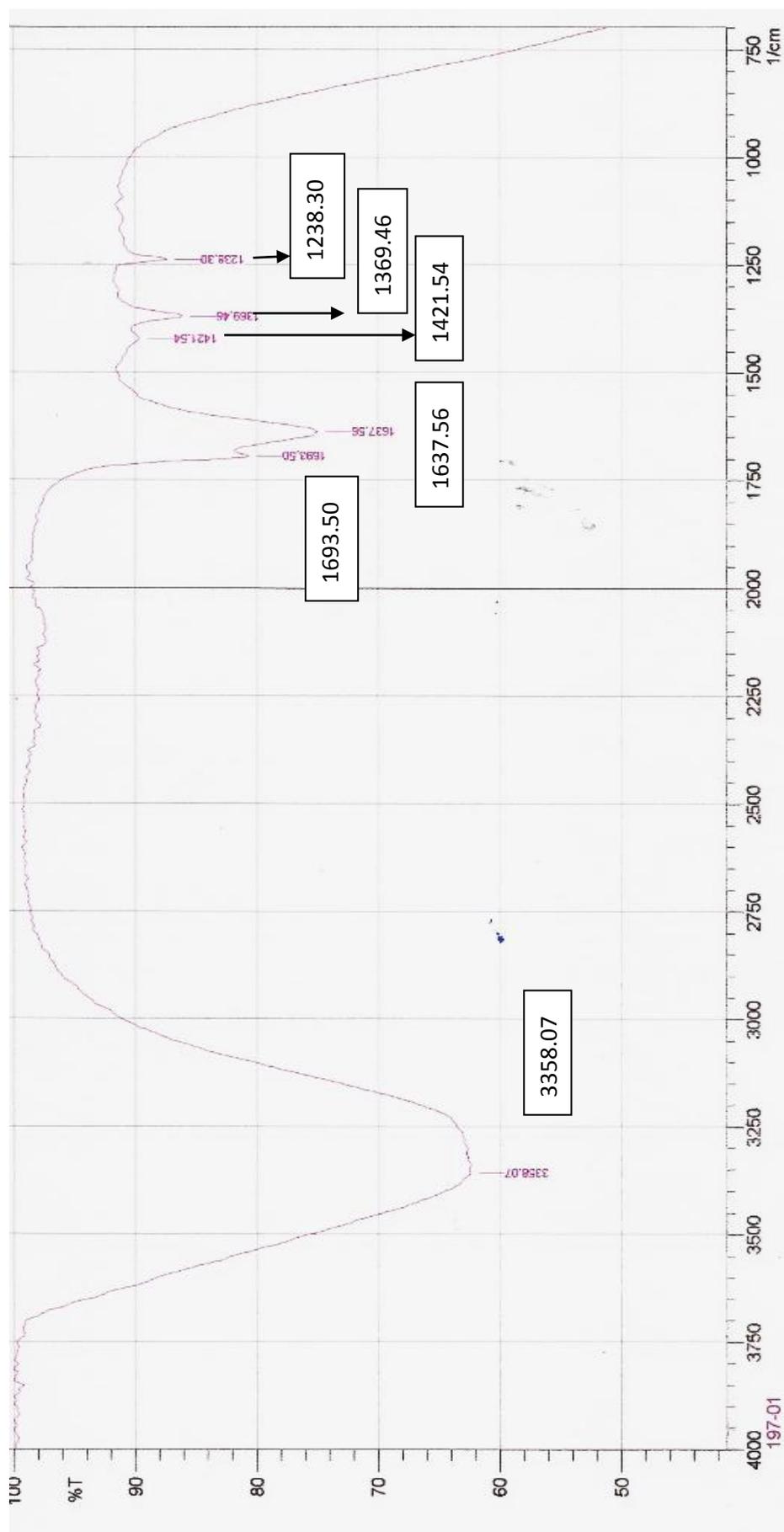
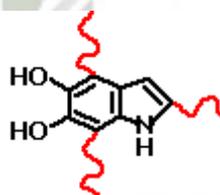


Figura16: Espectro IR del pigmento producido por la cepa nativa de *Streptomyces*

Las melaninas son pigmentos compuestos cuya estructura varía de muchas formas, pero algunos grupos funcionales, mencionados anteriormente, se mantienen. Además es importante destacar su solubilidad en agua a diferentes valores de pH, otras melaninas encontradas que fueron producidas por *Streptomyces coelicolor* se solubilizaban a un pH mayor a 8 y precipitaba a un pH menor a 3; principio que fue utilizado para la extracción del pigmento del medio y que también es usado en este trabajo.^{51,52,54} el cambio de color característico entre marrón rojizo y amarillo claro al cambio de pH; así como su solubilidad a solventes como el metanol, cloroformo y diclorometano, que son características de este grupo de pigmentos.⁵³

16.a. Eumelanin monomer (DHI)
thought to dominate in black melanin



16.b. Eumelanin monomer (DHICA)
thought to dominate in brown melanin

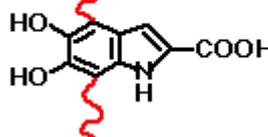


Figura 17: estructura básica de una melanina monómeros de su forma normal y oxidada 16.a. DHI y 16.b. DHICA⁵⁵

4.2.11. PRUEBAS DE ACTIVIDAD DE PIGMENTO

4.2.11.1. Prueba de citotoxicidad en linfocitos humanos

Para el ensayo de citotoxicidad en celular, mostrada en la Tabla No. 17, se evaluó la viabilidad celular. La viabilidad es el conteo y expresión en porcentaje de los linfocitos vivos y en relación a los muertos obtenidos con la técnica de Ficoll-Hypaque. Se encontró que la concentración media a la cual los linfocitos mueren en un aproximado de un 50% se encuentra por encima de los 2 mg/mL. Cuando la concentración del blanco estándar que en

este caso es el peróxido de hidrógeno no supera los 0.6 mg/ mL; por lo que podemos asumir que el pigmento es únicamente citotóxico a altas concentraciones.

Sin embargo, son necesarios más estudios para la verdadera comprobación de su toxicidad, de la misma forma que si el organismo humano es capaz de degradar el compuesto antes de alcanzar su nivel de citotoxicidad, ya que fue evaluado directamente en componentes de sangre y no en los sistemas de asimilación del organismo.

Tabla 17: Evaluación de citotoxicidad en linfocitos

Citotoxicidad en linfocitos														
0			0.5			0.75			1			2		
V	M	B	V	M	B	V	M	B	V	M	B	V	M	B
145	31	82%	151	27	84%	74	16	80	93	42	68	58	54	51

4.2.11.2. Prueba de capacidad antioxidante usando el método FRP

Para el análisis de la actividad presente en el pigmento, se realizaron tres pruebas básicas. En la prueba de actividad antioxidante se realizó una prueba derivada de la FRP, mostrada en la Tabla No. 18, en la cual se utiliza un ion de hierro el cual de la misma manera que los reactivos enzimáticos, se reduce para generar un color amarillo.

Este método es mucho más barato en costos ya que utiliza reactivos minerales los cuales son más fáciles y económicos de conseguir, a diferencia de los reactivos usualmente usados que son difíciles de conseguir y relativamente costosos, en especial en prueba de ensayo pequeñas y simples.

Este método tiene su preparación de reactivo desde un inicio de sus componentes minerales, además el reactivo utilizado tiene un tiempo de vida más largo en comparación al normalmente usado y genera al mismo color amarillo medible. Este ensayo demuestra que el pigmento podría tener una actividad antioxidante frente a otros componentes.

Tabla18: Datos de la prueba de capacidad antioxidante usando el método FRP

Actividad antioxidante									
Blanco		Patrón		M1		M2		M3	
SN	A	SN	A	SN	A	SN	A	SN	A
X		X		X		X		X	

4.2.11.3. Prueba de capacidad antimicrobiana en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*

Finalmente en la evaluación de la actividad microbiana, presentado en la Tabla 19, sugiere que el pigmento obtenido de la cepa nativa de *Streptomyces* no es un agente antimicrobiano, ya que no se presenta ningún tipo de halo que inhiba el crecimiento de las bacterias utilizadas, a diferencia de los antibióticos comerciales los cuales se utilizan como un control positivo.

Tabla19: Datos de prueba de actividad microbiana.

Actividad antimicrobiana									
Penicilina		Lincomicina		M1		M2		M3	
SC	Halo	SC	Halo	SC	Halo	SC	Halo	SC	Halo
	X		X		X		X		X

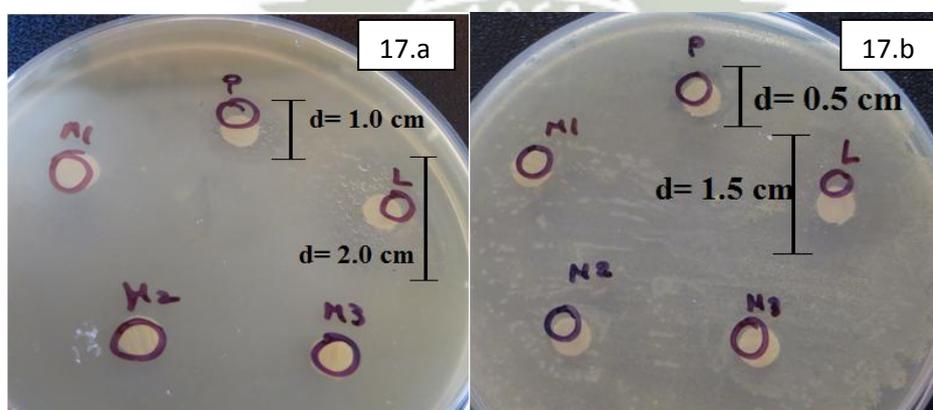


Figura 18: Placas de cultivo en las cuales se evaluó la posible actividad antimicrobiana del pigmento. 17. a. placa de evaluación en *E. Coli*, 17.b. placa de evaluación en *S. aureus*.

4.2.12. RELACIÓN ENTRE LA PRODUCCIÓN DE PIGMENTO Y EL CRECIMIENTO BACTERIANO

4.2.12.1. Relación entre el pH y la producción de pigmento

Tabla20: relación entre la producción de pigmento y el crecimiento de la bacteria con el factor pH.

pH	5	6	7	8	9
bacteria	0.87	1.085	1.25	0.76	0.67
pigmento	0.4596	0.4408	0.7026	0.5707	0.3884

COEFICIENTE DE CORRELACIÓN

0.63075795 positiva
moderada

En la Tabla N° 20 se observan los valores de pesos tanto del pigmento como de la bacteria, estableciéndose una relación directa entre el aumento de peso de la bacteria y aumento de producción de pigmento a los diferentes valores de pH. Los valores de peso expresados en el cuadro se encuentran en gramos por litro de medio.

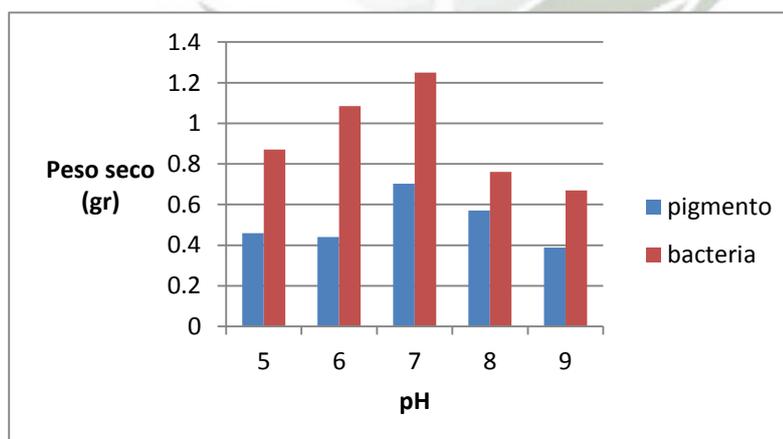


Figura19: Cuadro de comparación entre el crecimiento de la bacteria y la producción de pigmento a los diferentes valores de pH de estudio.

En la Figura 19 se muestra la relación del crecimiento de la bacteria, expresado en gramos de peso seco de micelio obtenido en relación a los gramos obtenidos de rendimiento de pigmento, en los 5 valores de pH establecidos para este trabajo. Mientras que en la figura No. 20 se observa el gráfico de correlación entre el peso de la bacteria y el peso del pigmento producido.

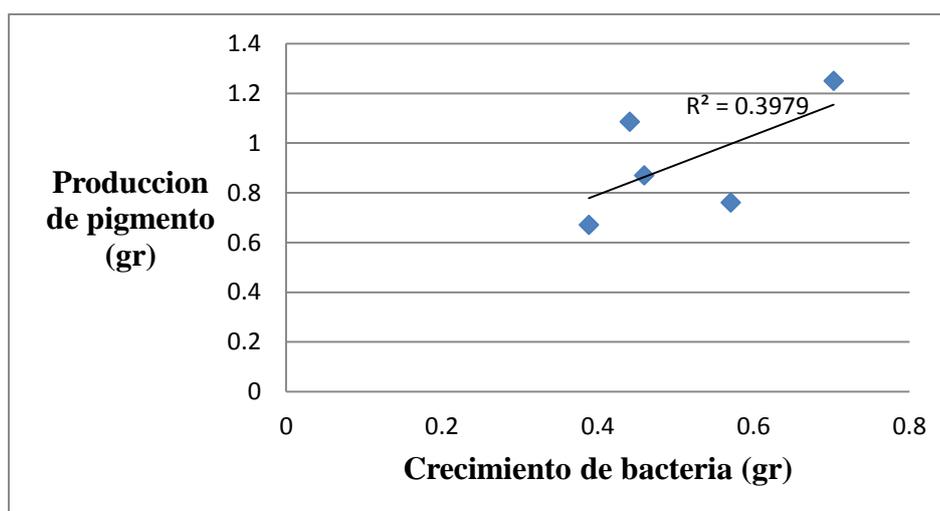


Figura20: Diagrama de correlación de los pesos de crecimiento de bacteria y producción de pigmento.

4.2.12.2. Relación entre la temperatura y la producción de pigmento

Tabla21: Relación de pesos entre el crecimiento de la bacteria y la producción de pigmento

Temperatura				
20	28	37	44	52
0.735	0.79	1.05	0.795	0.64
0.2094	0.2299	0.5402	0.4574	0.2533

COEFICIENTE DE CORRELACIÓN

0.79738705

positiva alta

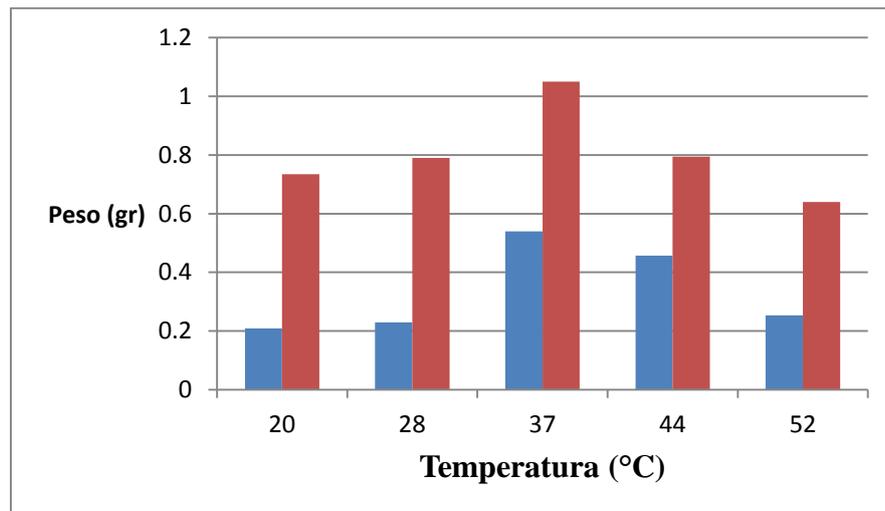


Figura21: Relación entre el crecimiento de la bacteria y la producción de pigmento a los diferentes valores de temperatura estudiados.

En la Tabla 21 y la Figura 21 y 22 se encuentra la relación entre el crecimiento de la bacteria nativa de *Streptomyces* y la producción de pigmentos a los diferentes valores de temperatura estudiados y propuestos en el presente trabajo.

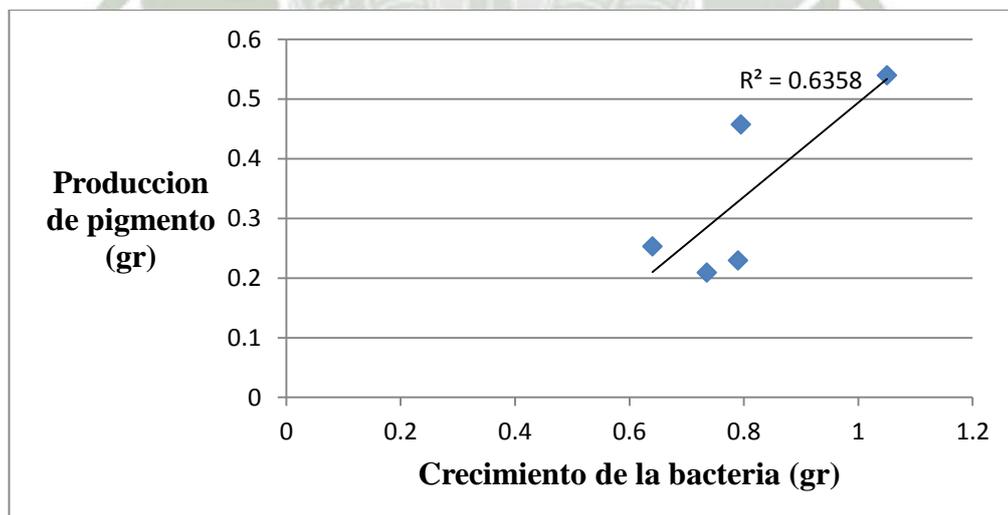


Figura22: Correlación entre el crecimiento de la bacteria expresado en gramos por litro de medio y la producción de pigmento expresada en gramos por litro de medio a diferentes valores de Temperatura.

4.2.12.3. Relación entre el % de extracto de tierra y la producción de pigmento

Tabla22: Relación de pesos entre el crecimiento de la bacteria y la producción de pigmento a diferentes valores de concentración de extracto de tierra.

% extracto de tierra	25	30	40	50
bacteria	1.125	1.21	1.75	1.655
pigmento	0.2146	0.2497	0.2462	0.2428

COEFICIENTE DE CORRELACIÓN

0.54716408

Positiva
moderada

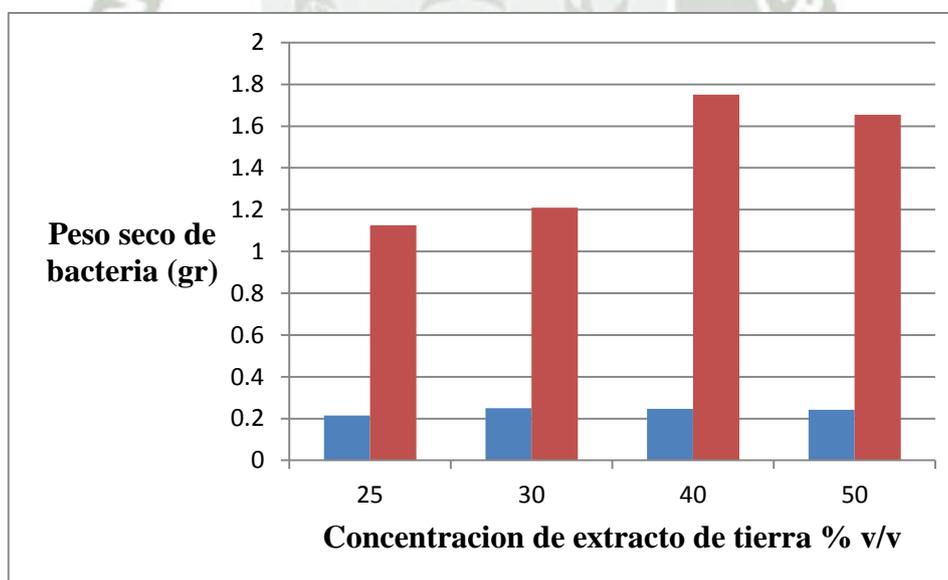


Figura23: Comparación entre el crecimiento de la bacteria y la producción de pigmento a diferente concentración de extractos de tierra.

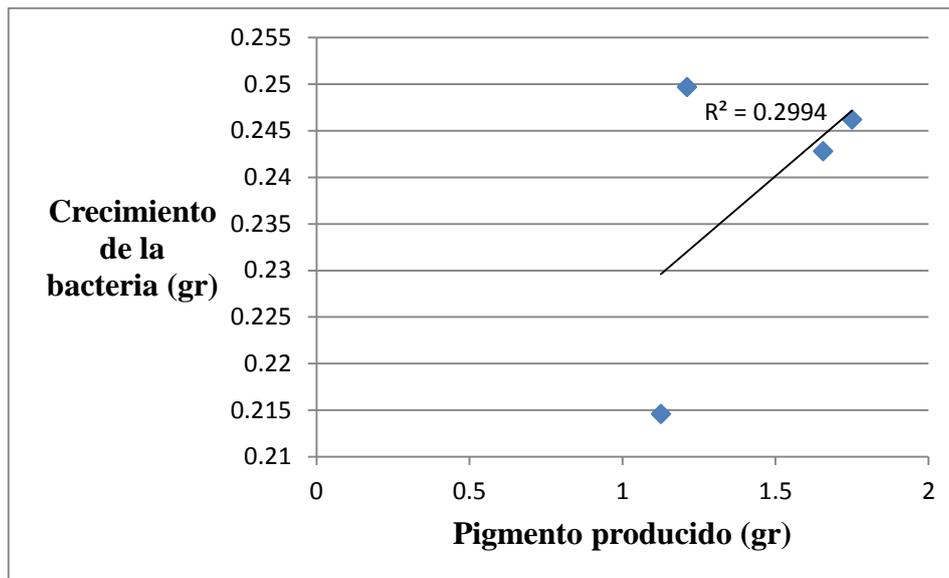


Figura24: Correlación del crecimiento de la bacteria y al producción de pigmento a diferentes concentraciones de extracto de tierra en el medio de cultivo.

En la figura 24 se presenta la correlación entre el crecimiento de la bacteria y la producción de pigmento a los diferentes valores de concentración de Extracto de Tierra: 25% 30% 40% y 50%. En el cual el valor optimo se alcanza a una concentración de 30%.

4.2.12.4. Relación entre el % de extracto de malta y la producción de pigmento

Para el estudio realizado, se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson, el cual nos permite definir si dos variables presentan tanto una relación positiva o negativa, el valor máximo de este coeficiente es uno, en caso de una correlación perfecta, en nuestro trabajo se alcanzó un máximo de 0.99 en la correlación del sustrato carbonado, que es indispensable para el crecimiento de la bacteria; no se logró una correlación perfecta ya que, a diferencia de ciencias físicas en las cuales se obedece una ley absoluta, el crecimiento de un ser vivo y la producción de compuestos mediante enzimas está mediado por muchos factores, y no puede presentarse únicamente con una ley el desarrollo de una bacteria o la producción de un metabolito secundario, lo que busca este estudio es resaltar cuatro de estos factores que son considerados importantes en relación a los demás. De esta forma y aplicando el conocimiento

adquirido, cada valor del coeficiente de Pearson recae en ciertas categorías las cuales pueden determinar aproximadamente si una relación es medianamente positiva, fuertemente positiva o perfecta. Sin embargo, estas categorías no nos dan un valor exacto que pueda ser medible, son una expresión de magnitud, por lo que es necesario ser explicadas y adaptadas al tipo de estudio que pueda realizarse.

Tabla23: relación de pesos entre el crecimiento de la bacteria y la producción de pigmento a diferentes concentraciones de Extracto de Malta

% extracto de malta	25	30	40	50
bacteria	0.265	0.285	0.555	0.56
pigmento	0.2298	0.2284	0.3069	0.3045

COEFICIENTE DE CORRELACIÓN

0.99742027

muy alta

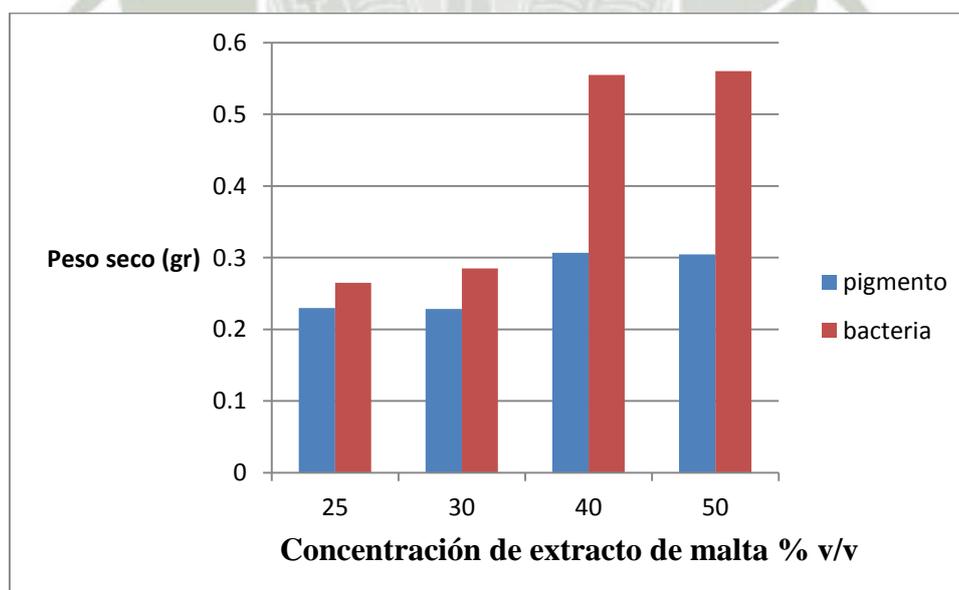


Figura25: Comparación entre el crecimiento de la bacteria, expresada en peso seco de micelio, y la producción de bacteria

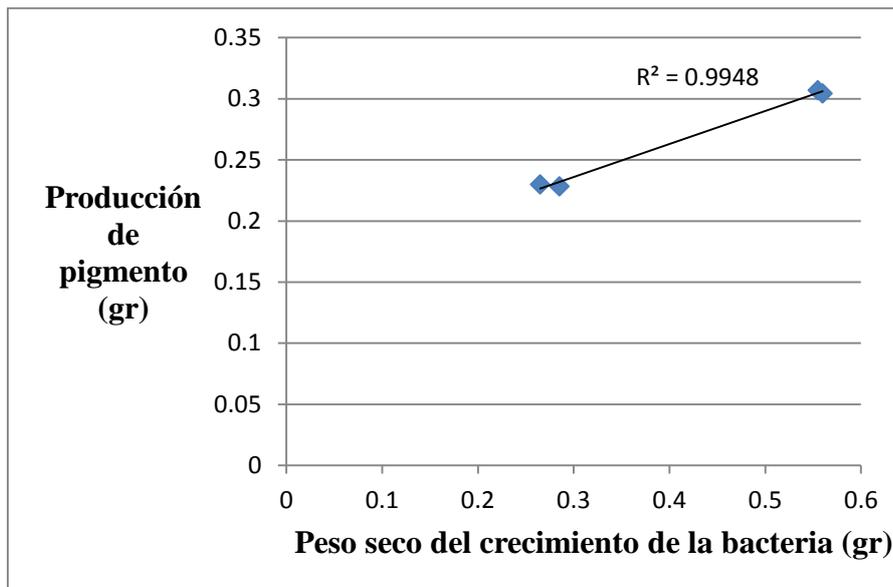


Figura26: Correlación entre la producción de pigmento y el crecimiento de la bacteria a diferentes valores de Extracto de Malta.

Bajo este criterio, en nuestro trabajo se analizaron cuatro factores, en la relación presentada en valores de pH, la bacteria presenta una relación positiva moderada, asumimos que esto puede deberse a propia naturaleza que presenta la bacteria, los Actinomicetos presenta la capacidad de resistir a los cambios de pH, hasta cierto punto antes que su pared celular sea disuelta, a diferencia de las Arqueas, que son capaces de resistir valores de pH inferiores a 2; los Actinomicetos son capaces de resistir hasta un pH de 5 a 4,5. Por lo que el factor de pH tiene efecto en el crecimiento y producción de la bacteria, pero no determinante para su producción. En el caso de la temperatura, el valor es más determinante, ya que una temperatura adecuada para el crecimiento no solo lo posibilita, lo beneficia en gran medida, permitiendo alcanzar un valor exponencial en menor cantidad de tiempo, lo que permite la producción de pigmentos en menor tiempo y aumenta su acumulación.

Para la evaluación de la concentración del sustrato carbonado y extracto de tierra, el criterio de evaluación cambia, ya que estos dos componentes vienen directamente en el medio, y es la manera en la que la bacteria los utiliza lo que permite la producción del pigmento de una forma óptima. El sustrato carbonado es determinante, y presenta el mayor valor de correlación positiva en el trabajo, y esto depende a que el almidón presente en el

extracto de malta permite el crecimiento de la bacteria y la diferenciación, de esta forma la bacteria llega fácilmente a su punto máximo de producción al llegar a la concentración suficiente, a diferencia de los valores de pH y temperatura, puede ser alto, pero la bacteria no consumirá más de lo que necesita para su máximo. Caso también del extracto de tierra, que es posible que una concentración excesiva de los iones presentes en la misma como el fierro y el magnesio dificulten el buen funcionamiento de las enzimas presentes en la bacteria, porque lo que es necesario un aporte justo para el mismo.



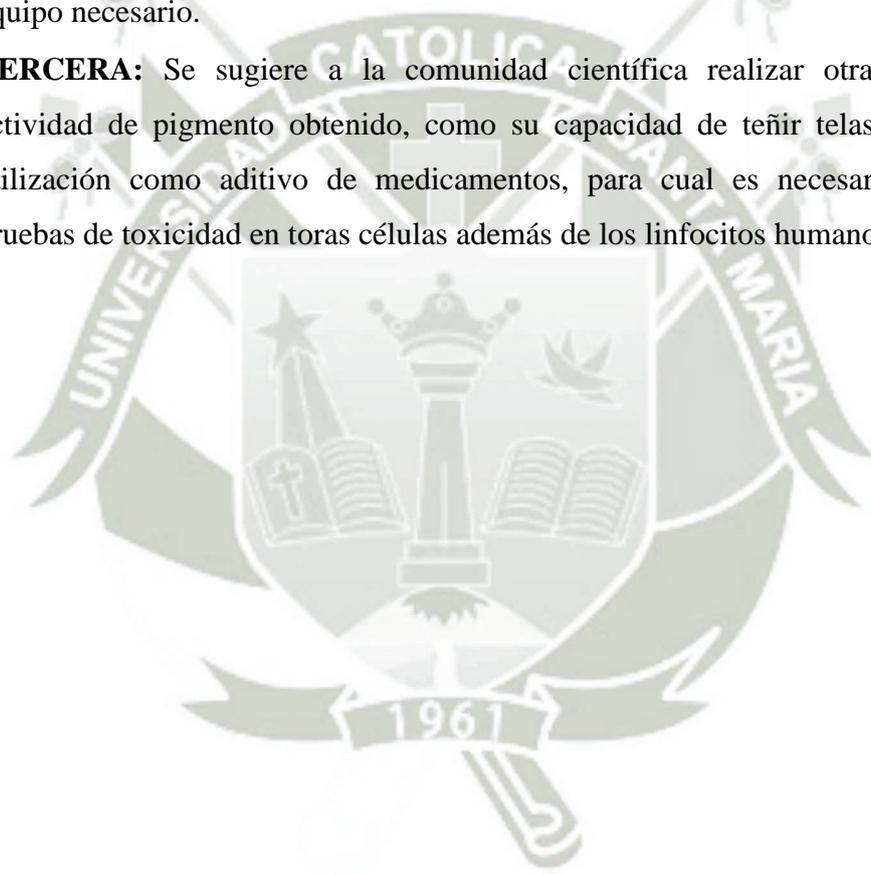
CAPÍTULO V

5.1.CONCLUSIONES

- **PRIMERA:** En conclusión, el crecimiento de la cepa nativa de *Streptomyces* aislada del manantial “ojo del milagro” presenta una relación directa con la producción de un pigmento natural de color pardo, el cual tiene utilidad biotecnológica. Esta relación directa presenta un crecimiento y producción óptimos a una temperatura de 37°C, un valor de pH de 7, una concentración de extracto de tierra de 30% v/v y una concentración de extracto de malta de 40% v/v.
- **SEGUNDA:** En el presente trabajo, se logró aislar una cepa perteneciente al género *Streptomyces*, a partir de la muestra de tierra de campos de cultivo de maíz en el manantial “ojo del Milagro” es una bacteria filogenéticamente nueva, Gram positiva, que presenta micelio aéreo de color blanco y un micelio reverso de color amarillo; y produce un pigmento difusible de color pardo.
- **TERCERA:** A partir de la bacteria, se pudo obtener y aislar un pigmento de color pardo, el cual puede cambiar de color a valores altos o bajos de pH, es soluble en acetona y otros solventes apolares, y presenta un espectro de absorción infrarroja muy parecido a las melaninas, por lo que podemos inferir que pertenece al grupo de las melaninas.
- **CUARTA:** El pigmento obtenido a partir de la bacteria nativa de *Streptomyces* 2.2.B presenta actividad antioxidante en comparación al patrón utilizado de sulfato de Hierro. Además el pigmento presenta baja citotoxicidad, teniendo una mortalidad media a una concentración de 2 mg/mL
- **QUINTA:** Se realizó una correlación entre el crecimiento de la bacteria y la producción de pigmentos en diferentes valores de pH, temperatura % de extracto de tierra y de malta; se encontró que los valores óptimos de producción son: un pH 7, 37°C de temperatura y un % de extracto de tierra y malta de 30 y 40% respectivamente. Siendo la relación positiva y directa entre el crecimiento y producción.

5.2.RECOMENDACIONES

- **PRIMERA:** a la comunidad científica se sugiere aislar y caracterizar otros ejemplares del genero *Streptomyces* de la localidad que sean capaces de producir pigmentos naturales que pueda ser de interés; aumentando el conocimiento de estos microorganismos.
- **SEGUNDA:** Se sugiere realizar más evaluaciones en el pigmento para determinar su estructura, debido a que no es posible realizarse en el trabajo por la falta de equipo necesario.
- **TERCERA:** Se sugiere a la comunidad científica realizar otras pruebas de actividad de pigmento obtenido, como su capacidad de teñir telas, impresión y utilización como aditivo de medicamentos, para cual es necesario hacer más pruebas de toxicidad en toras células además de los linfocitos humanos.



REFERENCIAS

1. V. K. Joshi, D. Attri, A. Bala, S Bhushan. *Microbial Pigments*. Indian Journal of Biotechnology. Vol 2, pp. 362-369. (2003)
2. Ahmad A. et al. *Application of Bacterial Pigments as Colorant*. Springer Briefs in Molecular Science. (2012)
3. Diraviyam T. et al. *Antioxidant activity of melanin pigment from Streptomyces species D5 isolated from Desert soil, Rajasthan, India*. DrugInventiontoday. 3 (3), 12-13. (2011)
4. D. B. Shirling, D. Gottlieb. *Methods for characterization of Streptomyces species*. International Journal of Systematic Bacteriology. 16, No. 3, pp-313-340. (1966)
5. Franco Correa M. *Evaluación de caracteres PGPR en Actinomicetos e Interacciones de estas Rizo bacterias con Hongos Formadores de Micorrizas*. Granada, (2008).
6. Salazar Loaiza A, Ordoñez Guerrero C. *Aislamiento e identificación de Actinomicetos fijadores de nitrógeno en suelo del jardín botánico de la universidad tecnológica de Pereira*. Universidad Tecnológica de Pereira, (2013).
7. Franco Correa M. *Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización*. Universidad Mayor de San Marcos. Rev. Perú. Biol. 16(2): 239-242. (2009)
8. Vijayakumar R. et al. *Optimization of Antimicrobial Production by a Marine Actinomycete Streptomyces afghaniensis VPTS3-1 Isolated from Palk Strait, East Coast of India*. Indian J Microbiol. 52 (2); 230-239. (2012).
9. H. Mukhtar, S. Ijaz, Ikram-Ul-Haq. *Production of antitumor antibiotic by Streptomyces capoamus*. Pak. J. Bot. **44** (1): 445 – 452. (2012)
10. B. Gurst, G. L. Challis, K. Fowler, T. Kieser, K. F. Chater. *PCR – targeted Streptomyces gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin*. PNAS, **100** (4):1541 – 1546. (2003)
11. Vasanthabharathi V. et al. *Melanin production from marine Streptomyces*. African Journal of Biotechnology Vol. 10(54), pp. 11224-11234, (2011).
12. K. Flårdh, M. J. Buttner. *Streptomyces morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium*. Nature reviews – Microbiology. **7**: 36 – 49. (2009)
13. Zhou Z. et al. *Genome plasticity and systems evolution in Streptomyces*. BMC Bioinformatics, 13 (10). (2012)

14. D.C. Parra. *Aislamiento y caracterización bioquímica y morfológica de bacterias reductoras de sulfato (BRS) provenientes de aguas de producción de un campo petrolero*. Universidad industrial de Santander. Bucaramanga. (2008)
15. Yepes A. *Sistema de dos componentes y regulación de la producción de antibióticos en Streptomyces coelicolor*. Tesis doctoral, Universidad de Salamanca. (2010).
16. S. A. Nikolova, N. Tzekova L. Yocheva. *Taxonomy of Streptomyces sp. Strain 3B*. Journal of culture collections. **4**: 36 – 42, (2005).
17. M. Arya, I. S. Shergill, M. Williamson, L. Gommersall, N. Ayra, H. R. Patel. *Basic principles of real – time quantitative PCR*. Expert Rev. Mol. Diagn. **5**(2), (2005).
18. QIAquick. *QIAquick Spin Handbook*. Pg. 6 – 14 (2008)
19. Bio – Rad Laboratories. *Real – Time PCR Applications Guide*. Pg. 4 – 20. (2006)
20. N. Sarute. *Detección del virus Distemper canino por RT – PCR en tiempo real y caracterización genética de aislamientos del Rio de la Plata mediante el análisis de los genes de la hemaglutinina y la proteína de fusión*. Tesis de Maestría. Universidad de la República de Uruguay.
21. T. Duffy. *Desarrollo y aplicación de estrategias de PCR para al genotipificación y cuantificación de Trypanosoma cruzi*. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires. (2010)
22. Taddei.A. *Isolation an Identification of Streptomyces spp. From Venezuelan Soils: Morphological and biochemical studies*. Microbiological Research 161, 222-231. 2006
23. Tamay de Dios L. et al. *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real*. Investigación en Discapacidad, Vol 2. N° 2. Pg 70-78. (2013)
24. Suarez V. *Caracterización Molecular de Bacterias Acido Lácticas aisladas de suero costeño*. Tesis Profesional. Universidad de La Sabana Bogotá. (2007).
25. Bou G. et al. *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. Enfermedades Infecciosas y microbiología Clínica. 29(8):601-608. (2011).
26. Herrea J. M. *Filogenia Bacteriana mediante el Análisis del rRNA 16S*. Universidad Nacional Autónoma de México.

27. Rodicio M, Mendoza M. *Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica*. Universidad de Oviedo. España.
28. Cercenado E., Cantón R. *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. Procedimiento en Microbiología. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. (2010)
29. Delgado Vargas F. et al. *Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins and Betalains- Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 40(3):173-289. (2000).
30. Gregori-Valdez B. et al. *Caracterización Estructural de Poliuretanos mediante Espectroscopia FTI-IR y RMN (H1 y C13)*. Revista Iberoamericana de Polimeros. Vol 9(4): 377-388. (2008)
31. I. Mondaca, P. Gortáres, J. Balderas, M. Meza, L. Castro. *Utilización de espectroscopia infrarroja FTIR para la detección de microorganismos*. Biociencias y Nanociencias. Pp. 1 – 7. (2010)
32. M. Velazco, E. Ocaña, J. Rubio, J. Oteo. *Análisis por FT – IR y DSC de la estructura de polvos de hidróxido de titanio obtenidos a partir de alcoxidos*. Bol. Soc. Esp. Ceram. Vidrio. **33**(5): 259 – 262. (2004)
33. Bystrykh L. et al. *Production of Actinorhodin Related “Blue pigments” by Streptomyces coelicolor A3(2)*. Journal of Bacteriology. Vol. 178 (8): 2238-2244. 1996.
34. Holkar S. et al. *Rhodomyacin analogues from Streptomyces purpurascens; isolation, characterization and biological activities*. Springer Plus,2:93. (2013).
35. Zhu H. et al. *Streptomyces vietnamensis* sp. Nov., a *Streptomyces* with violet-blue diffusible pigment isolated from soil in Vietnam. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol 57: 1770-1774. (2007)
36. Zhu H. et al. *Streptomyces caeruleatus* sp. Nov., with dark blue diffusible pigment. International Journal of Systematic Microbiology Vol. 61: 507-511. (2011).
37. Dastager S.G. et al. *Separation, identification and analysis of pigment (melanin) production in Streptomyces*. African Journal of Biotechnology vol. 5 (8), pp.1131-1134. (2006)

38. Amal. M. et al. *Selection of Pigment (Melanin) production in Streptomyces and their application in Printing and Dyeing of Wool Fabrics*. Research Journal of Chemical Sciences. Vol. 1(5), 22-28. (2011).
39. León. J. *Estudio de Actinomicetos Marinos Aislados de la Costa Central del Perú y su Actividad Antibacteriana frente a S. Aureus Meticilina resistentes y E. faecalis Vancomicina Resistentes*. RevPeruMedExp Salud Pública; 28(2): 237-246. (2011)
40. Peña K. *Evaluación « in-vitro » del potencial biológico de los actinomicetos aislados del suelo del jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira frente a control Fito patógeno del banano*. Universidad tecnológica de Pereira. (2013).
41. Gomez-Marin A., et al. *Efecto de Algunos Componentes del Medio de Cultivo en la Producción de Melanina Bacteriana*. Biotecnología, vol. 13, No. 12. (2009)
42. Bermudez J. et al. *Producción de biomasa de la microalga marina Chroomonasl. , en función del pH intensidad luminosa y salinidad*. Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras 31; pp 167-185. (2002).
43. J. Zhang, L. Zhang. *Improvement of an Isolation Medium for Actinomycetes*. Modern Applied Science, 5, No. 2, pp 124-127. (2011)
44. V. Moharasinivasan, P. SriramKalyan, N. Ipsita, C. Subathradevi, E. Selvarajan, V. Suganthi, S. Jemimah. *Fermentative production of extracellular pigmento from Streptomyces coelicolor MSIS₁*. Research Journal of Biotechnology. **8** (4): 31 – 41.(2013)
45. *Extracción de DNA con Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (PCI) a partir de Células Mononucleares o Líneas Celulares B Linfoblásticas Criopreservadas*. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. (2014)
46. P. Bahr, Y. Basulto. *El potencial reductor férrico (FRP). Un ensayo para evaluar la capacidad antioxidante en suero*. Universidad de Holguin. (2011)
47. Vasanthabharathi V. et al. *Melanin production from marine Streptomyces*. African Journal of Biotechnology Vol. 10(54), pp. 11225, (2011)
48. Cercenado E., Cantón R. *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Procedimiento en Microbiología*. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. (2010)
49. Salazar Loaiza A, Ordoñez Guerrero C. *Aislamiento e identificación de Actinomicetos fijadores de nitrógeno en suelo del jardín botánico de la universidad tecnológica de Pereira*. Universidad Tecnológica de Pereira, (2013)

50. Diraviyam T. et al. *Antioxidant activity of melanin pigment from Streptomyces species D5 isolated from Desert soil, Rajasthan, India*. *Drug Invention Today*. 3 (3), 10-15. (2011).
51. Vasanthabharathi V. et al. *Melanin production from marine Streptomyces*. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(54), pp. 11224-11234, (2011)
52. Dastager S.G. et al. *Separation, identification and analysis of pigment (melanin) production in Streptomyces*. *African Journal of Biotechnology* vol. 5 (8), pp 1132. (2006)
53. Vijayakumar R. et al. *Optimization of Antimicrobial Production by a Marine Actinomycete Streptomyces afghaniensis VPTS3-1 Isolated from Palk Strait, East Coast of India*. *Indian J Microbiol*. 52 (2); 230-239. (2012).
54. K. Laurence, Garger, J. Stephen, D. *Método para producir melaninas: Traducción de patente europea*. Oficina española de patentes y marcas. España. (2005)
55. T Sarna, HM Swartz, *The physical properties of melanins*, in *"The Pigmentary System"*, ed. JJ Nordlund et al., Oxford University Press, 1988
56. K. Wakamatsu, S. Ito. *Advanced Chemical Methods in Melanin Determination*. *PIGMENT CELL RES* 15: 174–183. 2002

ANEXOS

PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS PARA LA CARACTERIZACIÓN ISP

Preparación de medio de cultivo almidón -caseína agar

Tabla24: requerimientos para la preparación del medio almidón – caseína agar.

Reactivos	Cantidad para 1 litro (gr.)	Para 100 mL (5 placas) (gr)
• Almidón soluble	10	1
• Caseína hidrolizada	0.3	0.03
• K ₂ HPO ₄	2	0.2
• KNO ₃	2	0.2
• CaCO ₃	0.02	0.002
• FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0.01	0.001
• MgSO ₄ * 7H ₂ O	0.05	0.005
• Agar agar	20	2
• Agua destilada	1000 mL	100 mL

Ajustar el pH a 7.2 utilizando soluciones de NaOH 1N o HCl 1N; disolver previamente los componentes en la mitad del volumen y agregar el agar, calentar para completa disolución y autoclavar. Después de autoclavar, enfriar a 40 °C y agregar fluconazol a una concentración de 1 mg/mL Para la inhibición de hongos.

a) Preparación del medio ISP2 - Agar extracto de malta-Extracto de levadura

Tabla25: Requerimientos para la preparación del medio ISP 2

Reactivo	Gr. Para 1 litro	Gr. Para 50 mL (2 placas)
Extracto de malta	10.0	0.5
Extracto de levadura	4.0	0.2
Dextrosa	4.0	0.2
Agar-Agar	20.0	1.0
Agua destilada	1000 mL	50 mL

Diluir el extracto de malta y el extracto de levadura en agua destilada, agregar el agar y disolver completamente, ajustar el pH a 7.8 con una solución de NaOH o HCl 0.1 N. autoclavar y colocar en placas estériles de 20 mL De capacidad.

b) Preparación del medio ISP3 – Agar avena

Tabla26: Preparación del medio ISP3 – Agar avena

Reactivo	Gr. Para 1 litro	Gr. Para 50 mL (2 placas)
Avena	20.0	1.0
Solución de sales traza	1 mL	0.05 mL
Agar-Agar	18.0	0.9
Agua destilada	1000 mL	50 mL

Pesar la avena y diluir en parte del agua destilada, llevar a calentamiento por 20 minutos. Filtrar la mezcla con la gaza y quedarse con el sobrenadante, agregar el resto de agua destilada y el agar, disolver le agar, agregar la solución de sales traza y ajustar el pH a 7. Autoclavar y distribuir en dos placas estériles de 20 mL De capacidad.

c) Preparación del medio ISP5: Glicerol – Asparragina Agar**Tabla27: Preparación del medio ISP5: Glicerol – Asparragina Agar**

Reactivos	Gr. Para 1 litro	Gr. Para 50 mL (2 placas)
L-Asparragina	1.0	0.05
Glicerol	10.0	0.5
K ₂ HPO ₄ anhidro	1.0	0.05
Solución de sales traza	1mL	0.05 mL
Agar-agar	20	1.0
Agua destilada	1000 mL	50 mL

Disolver le glicerol en parte del agua destilada, agregar el resto de reactivos y disolver, agregar el agar y disolver en calor, agregar las sales traza y ajustar el pH a 7. Autoclavar y distribuir entre dos placas Petri de 20 mL De capacidad.

d) Preparación del medio ISP7: Agar Tirosina**Tabla28: Preparación del medio ISP7: Agar Tirosina**

Reactivos	Gr. Para 1 l.	Gr. Para 50mL
Glicerol	15	0.75
Tirosina	0.5	0.025
Asparragina	1.0	0.05
K ₂ HPO ₄ anhidro	0.5	0.025

MgSO ₄ *7H ₂ O	0.5	0.025
NaCl	0.5	0.025
FeSO ₄ * 7H ₂ O	0.01	0.0005
Solución de sales traza	1.0 mL	0.05 mL
Agar-agar	20	1.0
Agua destilada	1000 mL	50 mL

Disolver los químicos en el agua destilada, disolver el agar en calor y agregar la solución de sales traza, ajustar a pH 7 y autoclavar, distribuir en dos placas Petri de 20 mL De capacidad.

e) Preparación del medio ISP9: Medio de utilización de carbono

Tabla29: Preparación del medio ISP9: Medio de utilización de carbono

Reactivos	Gr. Para 1 l.	Gr. Para 100 mL
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.64	0.264
K ₂ HPO ₄ anhidro	2.36	0.236
K ₂ HPO ₄ * 3H ₂ O	5.65	0.565
MgSO ₄ * 7H ₂ O	1.0	0.1
Solución de sales de Pridam	1.0 mL	0.1
Agar – agar	15	1.5
Agua destilada	1000 mL	100 mL
Solución de azúcar	10%	1%

Disolver los componentes en agua destilada, junto con el agar y ajustar a pH 7. Autoclavar y distribuir en placas de 10 mL De capacidad. Disolver cada azúcar pos separada y agregar al medio con un filtro de 20 micras para lograr una concentración del 1%.

CUADRO DE CORRELACION DE PEARSON

Valor	Significado
-1	Correlación negativa grande y perfecta
-0,9 a -0,99	Correlación negativa muy alta
-0,7 a -0,89	Correlación negativa alta
-0,4 a -0,69	Correlación negativa moderada
-0,2 a -0,39	Correlación negativa baja
-0,01 a -0,19	Correlación negativa muy baja
0	Correlación nula
0,01 a 0,19	Correlación positiva muy baja
0,2 a 0,39	Correlación positiva baja
0,4 a 0,69	Correlación positiva moderada
0,7 a 0,89	Correlación positiva alta
0,9 a 0,99	Correlación positiva muy alta
1	Correlación positiva grande y perfecta

Tabla30: Tabla de caracterización de actinobacterias relacionadas o semejantes a la bacteria nativa de *Streptomyces*

Bacteria	Citrato Sim.	Ur	Lisina desc.	SI M	H 2S	G lu	S uc	M an	ISP 2			ISP 3			ISP 5			ISP 7			
									Mic. Aéreo	Reve rso											
<i>Streptomyces nativa</i>	+	+	+	-	-	+	-	+	blanco	amar illo	blanco	amar illo	amar illo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo
<i>Streptomyces graminofaciens</i>	+	+	-	-	-	+	+	+	blanco	amar illo	blanco	amar illo	amar illo	gris	gris	amarillo	amarillo	gris	gris	gris	amarillo
<i>Streptomyces griseinus</i>	+	+	-	-	-	+	-	+	sin color	ocre	sin color	marfil	marfil	sin color	sin color	marfil	marfil	sin color	sin color	sin color	ocre
<i>Streptomyces kurssanovii</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	gris	marr ón	beige	amar illo	amar illo	gris	gris	sin color	sin color	gris	gris	gris	marr ón
<i>Streptomyces peucetius</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	rojo	naranja	blanco	amar illo	amar illo	rojo	rojo	naranja	naranja	rojo	rojo	rojo	naranja
<i>Nocardia salmonicida</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	blanco	amar illo	sin color	amar illo	amar illo	sin color	sin color	amarillo	amarillo	sin color	sin color	sin color	amarillo
<i>Acrocarpospora corrugata</i>	-	+	-	-	-	+	+	+	sin color	ocre	sin color	ocre	ocre	sin color	sin color	ocre	ocre	sin color	sin color	sin color	ocre
<i>Actinocorallia libanotica</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	blanco	beige	blanco	beige	beige	sin color	sin color	beige	beige	sin color	sin color	sin color	beige