

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ACTINOBACTERIAS
PROVENIENTES DEL COMPOST DE RESIDUOS DE PRODUCCIÓN DE CAFÉ
ORGÁNICO**

ADRIANA CAROLINA PEÑA GAMBOA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2015**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ACTINOBACTERIAS
PROVENIENTES DEL COMPOST DE RESIDUOS DE PRODUCCIÓN DE CAFÉ
ORGÁNICO**

ADRIANA CAROLINA PEÑA GAMBOA

**Trabajo de Grado para optar el título de
Bióloga**

Tutor

JORGE HERNÁNDEZ TORRES

Doctor en ciencias

Co-tutora

Oriana Danuta Serna Daza, Bióloga

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

BUCARAMANGA

2015

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mis padres (QEPD) Graciela Gamboa y José Peña, a mi amado esposo Boris Ríos, porque creyeron en mí y estuvieron a mi lado brindándome su apoyo incondicional, gracias a ustedes por haber fomentado en mí el deseo de superación. Miles de palabras no son suficientes para agradecerles su apoyo, amor, comprensión y sus consejos en los momentos difíciles.

Los amo infinitamente.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a Dios, por regalarme la oportunidad de vivir cada día.

Al Doctor Jorge Hernández Torres, por permitirme hacer parte del Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Biología (LBM - UIS PTG).

Al grupo del Laboratorio (LBM - UIS PTG), especialmente a la Bióloga Oriana Serna.

A la Doctora Viviana Torres, por vincularnos en este macroproyecto.

A la DIEF - Facultad de Ingenierías Físicoquímicas de la Universidad Industrial de Santander por el financiamiento otorgado para la ejecución de esta investigación.

A los señores Oswaldo Acevedo y Fermín Alba, de la Hacienda 'El Roble' (Mesa de Los Santos) por facilitar la toma de muestras para los análisis realizados en este trabajo.

A los profesores de la Escuela de Biología.

A Cindy Pérez y Carlos Acosta, compañeros de estudio y amigos de vida.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN.....	12
1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
1.1 Toma de muestras.....	14
1.2 Aislamiento primario.....	15
1.3 Individualización de cepas de actinobacterias.....	16
1.4 Identificación de actinobacterias.....	16
1.4.1 Identificación molecular de las actinobacterias aisladas.....	16
1.4.2 Caracterización morfológica de los cultivos axénicos de actinobacterias.....	18
1.5. Criopreservación de cultivos.....	18
2. RESULTADOS.....	19
2.1. Identificación molecular de los aislados de actinobacterias.....	19
2.2. Caracterización morfológica de los cultivos axénicos.....	25
2.5. Identificación de actinobacterias.....	34
3. DISCUSIÓN.....	36
4. CONCLUSIONES.....	38
5. RECOMENDACIONES.....	39
BIBLIOGRAFÍA.....	40

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en la amplificación parcial del gen 16S ARNr.....	17
Tabla 2. Secuencias del gen 16S ARNr sugeridas por el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey's.....	22
Tabla 3. Resultados de las búsquedas mediante BlastN con las secuencias parciales del gen 16S ARNr.....	23
Tabla 4. Consolidado de caracteres morfológicos y moleculares usados en la determinación taxonómica de las actinobacterias aisladas a partir de compost de la BRA del café.....	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación del sitio de muestreo.....	15
Figura 2. Electroforesis 0.8% agarosa con extractos de ADN total.....	20
Figura 3. Electroforesis 1.2% agarosa con los productos de la amplificación parcial del gen 16S ARNr.....	21
Figura 4. Árbol de distancias construido por el método Neighbor-Joining basado en secuencias parciales del gen 16S ARNr.....	24
Figura 5. Características microbiológicas de las cepas aisladas del género <i>Micrococcus</i> (Cepas ACPG 1, 3, 7 y 12).....	26
Figura 6. Características microbiológicas de las cepas aisladas del género <i>Nocardiosis</i> (Cepas ACPG 4 y 5).....	27
Figura 7. Características microbiológicas de la cepa aislada del género <i>Microbacterium</i> (Cepa ACPG 6).....	28
Figura 8. Características microbiológicas de la cepa aislada del género <i>Arthrobacter</i> (Cepa ACPG 13).....	29
Figura 9. Características microbiológicas de las cepas aisladas del género <i>Cellulomonas</i> (Cepas 9, 10 y 17).....	31
Figura 10. Características microbiológicas de las cepas aisladas del género <i>Streptomyces</i> (Cepas 2, 14 y 20).....	33
Figura 11. Prevalencia de géneros en el compost.....	34

RESUMEN

TÍTULO: Aislamiento y caracterización de actinobacterias provenientes del compost de residuos de producción de café orgánico*

AUTORES: Adriana Carolina Peña Gamboa**

PALABRAS CLAVES: Actinobacterias, biomasa residual agrícola, compost, café orgánico.

El phylum *Actinobacteria*, es un grupo de procariontes que juega un papel importante en la sostenibilidad de sistemas naturales y agrícolas, ya que producen más de 7000 metabolitos entre los que se pueden discriminar antibióticos, agentes antitumorales e inmunosupresores y enzimas. En el presente trabajo se aislaron e identificaron morfológicamente y molecularmente las actinobacterias cultivables presentes en el compost de la biomasa residual agrícola (BRA) asociada a un cultivo de café orgánico en la Mesa de Los Santos, Santander. Las actinobacterias se aislaron mediante diluciones seriadas y resiembras en medios sólidos (agar Czapek-Dox y agar Czapek-Dox-Extracto de Levadura-Casaminoácidos). Se determinó la identidad de estos aislados mediante el uso combinado de características morfológicas y análisis moleculares basados en la secuenciación del gen 16S ARNr por medio de la técnica de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Fueron identificadas 14 cepas de actinobacterias distribuidas en 6 géneros *Micrococcus*, *Streptomyces*, *Nocardioopsis*, *Microbacterium*, *Cellulomonas* y *Arthrobacter*, siendo el primero de ellos el más frecuente en el compost de la BRA del café. Adicionalmente, se evidenció la presencia de 3 géneros *Microbacterium*, *Cellulomonas* y *Nocardioopsis*, no reportados previamente en estudios de compost a partir de la BRA del café. La variedad de actinobacterias identificadas evidencian la diversidad de estos microorganismos en el compost a partir de la BRA en fincas de producción orgánica de café, y debe representar una fuente excelente para el descubrimiento de nuevos microorganismos productores de compuestos bioactivos y de biocombustibles como metano e hidrógeno.

*Trabajo de grado modalidad Pasantía de Investigación.

**Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Director: Jorge Hernández Torres, Doctor en ciencias y Co-Tutora: Oriana Danuta Serna Daza, Bióloga.

ABSTRACT

TITLE: Isolation and characterization of actinobacteria from compost of residues in organically grown coffee crops*

AUTHORS: Adriana Carolina Peña Gamboa**

KEY WORDS: Actinobacteria, agricultural waste biomass, compost, organic coffee.

The phylum *Actinobacteria* is a group of prokaryotes that plays an important role in the sustainability of natural and agricultural systems. They produce more than 7000 metabolites including antibiotics that could be discriminated as antitumor enzymes and immunosuppressive agents. In the present work, a number of actinobacteria were isolated and identified by morphological and molecular methods. The strains were sampled from compost of Agricultural Residue Biomass (ARB) associated with an organic coffee crop at Mesa de Los Santos, Santander. Actinobacteria were purified by serial dilutions and growing on solid media (Czapek-Dox and Czapek-Dox-Yeast Extract-Casaminoacids agar). Taxonomic identification was achieved using a combination of morphological and molecular analysis based on 16S rRNA sequencing. We were able to identify 14 strains represented by 6 genera (*Micrococcus*, *Streptomyces*, *Nocardiopsis*, *Microbacterium*, *Cellulomonas* and *Arthrobacter*). According to the scientific literature, *Micrococcus* was the most frequent genus in compost from coffee ARB. Contrarily to previous reports, *Microbacterium*, *Cellulomonas* and *Nocardiopsis* were found for the first time in this kind of compost. The diversity of actinobacteria was higher than other works. The isolated strains represent an excellent opportunity to discover new microbial bioactive compounds, and biofuels as methane and hydrogen.

* Degree work, Research Internship.

** Science faculty, Department of Biology. Director: Jorge Hernández Torres, Doctor of Science and Co-Tutor: Oriana Danuta Serna Daza, Biologist.

INTRODUCCIÓN

La biomasa residual agrícola (BRA), está compuesta entre 60% y 75% por residuos agrícolas de cosecha (RAC) y entre 25% y 40% de residuos agroindustriales (RAI) (Minminas, 2011).

Se reportó que los cultivos existentes para 2011 generaron cerca de 72.000.000 Ton de BRA, con un potencial energético de 331.646 TJ/año (Minminas, 2011). Debido al alto potencial energético de la BRA, las investigaciones se han enfocado en la disposición de este recurso para la obtención de energías renovables como biogás (principalmente metano), biocombustibles líquidos de primera y segunda generación (bioetanol, biodiesel y biobutanol), y biocombustibles sólidos (carbón vegetal, astillas, aserrín, pellets y briquetas) (Cerdá, 2012; Lomas *et al.*, 2001; McKendry, 2002; Minminas, 2011; Serrano & Luque, 2011).

En relación con los principales cultivos nacionales, el cultivo de café representa solo el 7% de la BRA, pero ostenta uno de los mayores potenciales energéticos 49.107 TJ/año (Minminas, 2011), debido a que en el 2011, fue el cultivo con mayor área de siembra con 712.387 Ha. reportadas (MADR, 2012). La BRA de café también es aprovechada para la producción de abono orgánico (compost), mediante descomposición aerobia (Adams & Frostick, 2007); la pulpa de café tiene características adecuadas para el proceso de compostaje por su gran contenido de azúcares, relación carbono/nitrógeno (25-30:1) y un tamaño de partícula apropiado. Por ello, el proceso de compostaje a partir de este sustrato se ha generalizado como alternativa para el manejo de estos residuos (Pierre *et al.*, 2009).

En la transformación de materia orgánica y moléculas recalcitrantes (ej., celulosa, lignina y quitina) participan diferentes grupos de microorganismos en su mayoría bacterias del phylum *Actinobacteria* (Goodfellow & Williams, 1983); las actinobacterias son bacterias Gram positivas o Gram variables, que se caracterizan por la producción de compuestos con actividad biológica (Fenical & Jensen, 2006).

La mayoría de los antibióticos utilizados actualmente son producidos por las actinobacterias, como la estreptomicina, la tetraciclina, el cloranfenicol y la eritromicina, que son obtenidos a partir de diferentes especies del género *Streptomyces* (Challis & Hopwood, 2003; Magarvey *et al.*, 2004; Fenical & Jensen, 2006). Existen estudios sobre la composición microbiológica del compost, que incluyen métodos bioquímicos, morfológicos y moleculares, entre los que se destacan las actinobacterias (Adegunloye *et al.*, 2007; Cruz *et al.*, 2009; Rebollido *et al.*, 2008; Steger *et al.*, 2007). La estructura y la dinámica de las comunidades de actinobacterias han sido caracterizadas en compost a partir de la BRA del café, bajo diferentes condiciones, encontrándose géneros como *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Pseudonocardia*, *Sacchapolyspora* y *Streptomyces*. Este último puede estar presente en todas las fases del proceso de compostaje de la pulpa de café (Blandón *et al.*, 1998; Escobar *et al.*, 2012; Escobar *et al.*, 2013). Actualmente, poco se conoce sobre el potencial de las actinobacterias para la producción de hidrógeno (Wirth *et al.*, 2012).

En el presente trabajo se aislaron e identificaron morfológica y molecularmente las actinobacterias presentes en el compost de la biomasa residual agrícola (BRA) asociada a un cultivo de café orgánico, mediante la descripción de caracteres macroscópicos, microscópicos y el análisis de secuencias parciales del gen 16S ARNr. Se identificaron 14 cepas de actinobacterias pertenecientes a los géneros

Microbacterium, *Nocardiopsis*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Streptomyces*, *Arthrobacter* y *Cellulomonas*. Las cepas aisladas y caracterizadas serán empleadas en la segunda fase de este proyecto para la evaluación de su potencial en la producción de hidrógeno como biocombustible.

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Toma de muestras

La Hacienda 'El Roble' en el municipio de Los Santos (Santander), se distingue por ser la plantación de café orgánico bajo sombra más grande de Colombia. En la Hacienda, la BRA es utilizada para la producción de abono orgánico o compost en fase de descomposición de cerca de 40 días por pila (Figura 1A). La muestra de compost utilizada para el aislamiento fue colectada en bolsas estériles de polipropileno con cierre hermético y corresponde a 1 kg de compost de la última pila del tratamiento de compostaje (Figura 1B). Las muestras fueron transportadas a -4°C y procesadas en el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Biología (LBM – UIS PTG).



Figura 1. Ubicación del sitio de muestreo. A) Mapa con la ubicación del sitio de muestreo, Hacienda 'El Roble' Mesa de Los Santos - Santander (rombo verde). B) Última pila del tratamiento de compostaje.

1.2 Aislamiento primario

Se homogenizaron 100 g de muestra con 900 ml de agua destilada estéril; el producto filtrado se utilizó para la preparación de diluciones seriadas en agua destilada estéril, hasta 10^{-8} . Cada dilución se sembró mediante diseminación en Agar Czapek-Dox (ACD) suplementado con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de nistatina como antifúngico. Los cultivos fueron incubados en posición invertida a temperatura ambiente ($\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) por un periodo de 14 días. Durante el periodo de incubación se realizó seguimiento a los cultivos, con registro de caracteres taxonómicos relevantes y documentación fotográfica.

1.3 Individualización de cepas de actinobacterias.

Seleccionadas las colonias a individualizar, se transfirieron a agar Czapek-Dox - Extracto de levadura-Casaminoácidos (CYC) (Cross & Attwell, 1974) ajustado a pH 7.0 y suplementado con 50 µg/mL de nistatina. Resiembras fueron realizadas bajo las mismas condiciones hasta obtener cultivos axénicos.

1.4 Identificación de actinobacterias

1.4.1 Identificación molecular de las actinobacterias aisladas

1.4.1.1 Extracción de ADN total

Partiendo de cultivos de cada cepa aislada en medio Luria-Bertani (LB) se obtuvieron los extractos de ADN total mediante el protocolo de Ausubel *et al.* (1992), después del lavado con fenol/cloroformo/alcohol isoamil, se lavó con un volumen igual de cloroformo para eliminar impurezas del ADN, el ADN fue resuspendido en 50 µL de TE-RNAsa 25mg/ml. Los extractos obtenidos fueron coloreados con Ez-Vision III® (Amresco, Solon, Ohio, USA) y visualizados en geles 0.8% agarosa.

1.4.1.2 Amplificación por PCR y secuenciación del gen 16S ARNr

Se amplificó parcialmente el gen 16S ARNr de las actinobacterias aisladas, mediante PCR con los oligonucleótidos F243 - ACT1159R (Heuer *et al.*, 1997; Blackwood *et al.*, 2005), EUB338F - ACT1159R (Guo *et al.*, 2008; Blackwood *et al.*, 2005) y 27F - 1492R (Acosta *et al.*, 2009); la mezcla de reacción se hizo según lo descrito por Revollo *et al.* (2012) con modificaciones en la temperatura de hibridación para cada juego de oligonucleótidos (Tabla 1). Los amplificados obtenidos fueron purificados con el kit GeneJET PCR® (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) y secuenciados por Macrogen Inc. (Corea) mediante electroforesis capilar.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en la amplificación parcial del gen 16S ARNr.

Par	Oligonucleótidos	Tamaño (pb)	Secuencias de oligonucleótidos	Temperatura de hibridización
1	EUB338F	821	5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGCAG-3'	58 °C
	ACT1159R		5'-TCCGAGTTRACCCCGGC-3'	
2	EUB 27F	1465	5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3'	58 °C
	1492R		5'-GGTTACCTTGTACGACTTT-3'	
3	243F	916	5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3'	60 °C
	ACT1159R		5'-TCCGAGTTRACCCCGGC-3'	

1.4.1.3 Análisis de secuencias

Con las secuencias obtenidas se realizó captura de secuencias de referencia mediante búsquedas de similares con la aplicación BlastN en la base de datos NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) y las secuencias de referencia del Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey's (Goodfellow *et al.*, 2012). Para cada secuencia, se revisó la presencia de quimeras usando el programa de análisis en línea *Bellerophon* (Huber *et al.*, 2004).

La atribución de taxones a los genes 16S ARNr secuenciados se realizó mediante análisis de distancia genética entre las secuencias de referencia y las secuencias de las actinobacterias aisladas. La determinación taxonómica se asignó de acuerdo con los porcentajes de identidad genética así: secuencias con >95% de identidad fueron asignadas a un género (Ludwig & Schleifer, 1994) y >97% para el caso de especie (Stackebrandt & Goebel, 1994). La matriz se obtuvo mediante alineamientos con el algoritmo *Muscle* (Robert, 2004) y el árbol de distancia se construyó por el método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) con la aplicación MEGA V6 (Tamura *et al.*, 2013).

1.4.2 Caracterización morfológica de los cultivos axénicos de actinobacterias

1.4.2.1 Caracterización macroscópica Se realizó seguimiento continuo de los aislados en agar CYC, registrándose caracteres como: morfología de la colonia, tipo y color del micelio aéreo, en caso de presentarse (Ramírez & Cocha, 2003; Otero, 2011; Goodfellow *et al.*, 2012).

1.4.2.2. Caracterización microscópica La identificación taxonómica con base en características microscópicas como presencia de esporas, presencia y forma de filamentos y coloración de Gram se realizó según lo descrito en el manual de sistemática bacteriológica de Bergey's (2012). Se evaluó la presencia de esporas mediante la tinción de Wirtz-Conklin con 0,1% verde de malaquita y 0,5% safranina (Schaeffer & Fulton, 1933). La presencia y forma del micelio se obtuvo por incrustación de laminillas estériles en el medio de cultivo, inclinadas en ángulo de 45° (Wang *et al.*, 1999). Tras 14 días de incubación a temperatura ambiente (~25 °C), se extrajeron las laminillas y se realizó el montaje con Violeta de Genciana para su observación.

1.5. Criopreservación de cultivos

Los cultivos en medio líquido LB fueron criopreservados en 20% de glicerol de acuerdo con el protocolo propuesto por Sambrook & Russell (2001) y almacenados por triplicado a - 20°C y - 70°C en el cepario del Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Biología (LBM – UIS PTG).

2. RESULTADOS

A partir de una muestra de compost de BRA del cultivo de café orgánico, se obtuvieron 20 aislados con variabilidad morfológica denominados en adelante cepas ACPG. La caracterización molecular y morfológica de las cepas aisladas confirmó que el 100% pertenece al filo *Actinobacteria*. A continuación, se describe la asignación taxonómica de las cepas y se detalla para cada género las características macroscópicas y microscópicas de los aislados.

2.1. Identificación molecular de los aislados de *Actinobacteria*

Inicialmente, de cada cepa se obtuvieron extractos de ADN total de alto peso molecular >20 kb y en la mayoría de buena calidad (Figura 2). Las extracciones presentaron un rendimiento promedio de ~35 ng/μl. Para complementar la determinación morfológica, se recurrió a técnicas de biología molecular.

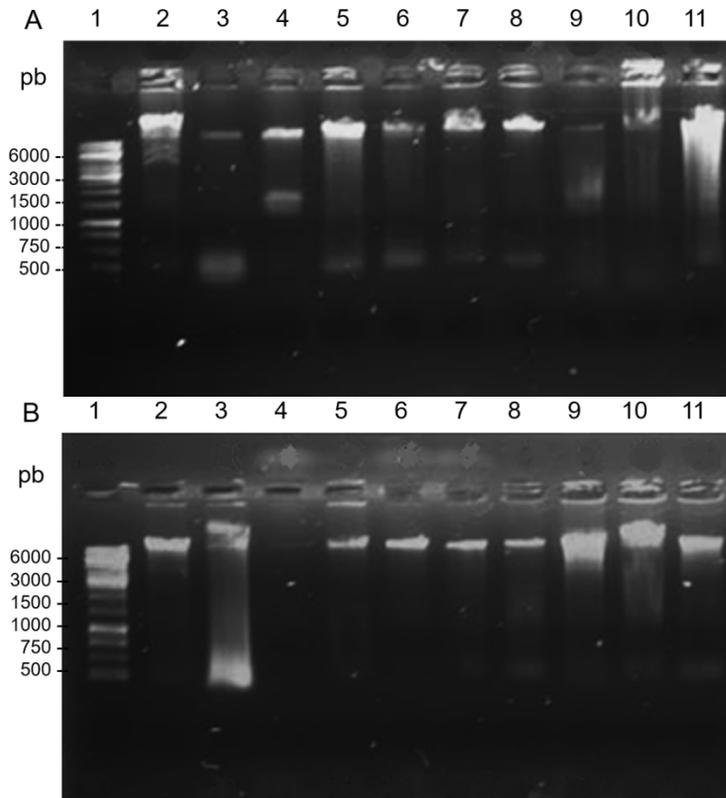


Figura 2. Electroforesis 0.8% agarosa con extractos de ADN total. Marcador de peso molecular 1 Kb® [carril 1]. A) Extractos de las cepas ACPG 1-10 [carriles 2-11]. B) Extractos de las cepas ACPG 11-20 [carriles 2-11].

Para la identificación molecular de los aislados bacterianos, se llevó a cabo la amplificación por PCR de las regiones hipervariables V3 - V6 del gen 16S ARNr correspondientes a las posiciones 433-1043 (*E. coli*) usando diferentes parejas de oligonucleótidos. De esta forma se generaron fragmentos que abarcaron entre 821 a 1465 pb (Figura 3). Los amplificados obtenidos fueron purificados y secuenciados por MacroGen Inc. (Corea) mediante electroforesis capilar con secuenciador automático ABI3730XL®.

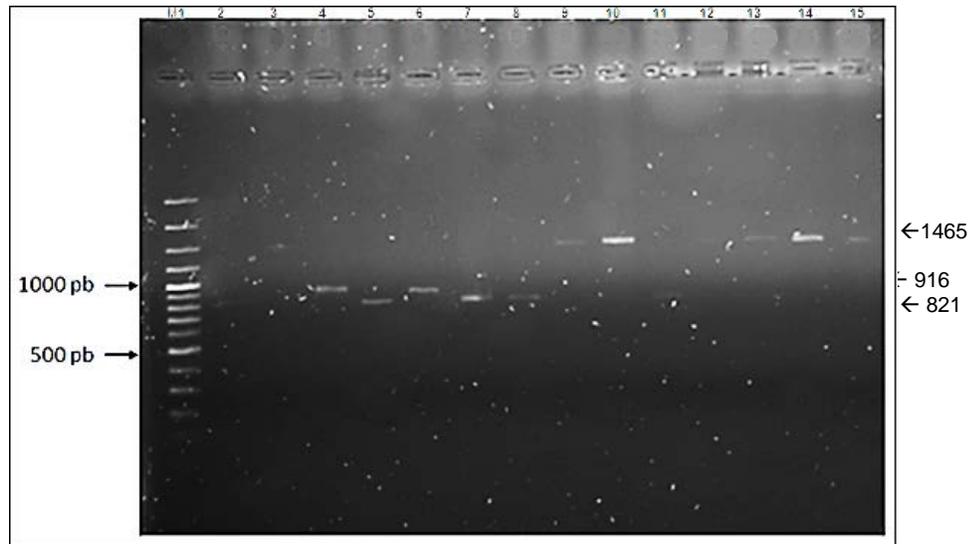


Figura 3. Electroforesis 1.2% agarosa con los productos de la amplificación parcial del gen 16S ARNr. Los productos fueron amplificados utilizando los oligonucleótidos 27F - 1492R, 338F - 1159R y 243F - 1159R. Carril M1: Marcador de peso molecular 100 pb Plus® (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Carriles 2 -15: ACPG 1, ACPG 2, ACPG 3, ACPG 4, ACPG 5, ACPG 6, ACPG 7, ACPG 9, ACPG 10, ACPG 12, ACPG 13, ACPG 14, ACPG 17 y ACPG 20.

A partir de búsquedas con la aplicación BlastN en Genbank se realizó la asignación preliminar de taxones a las cepas aisladas. Se descargaron las secuencias de referencia del Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey's (Tabla 2). La mayoría de las secuencias obtenidas mostraron porcentaje de identidad >97% con los géneros: *Micrococcus*, *Streptomyces*, *Nocardiosis*, *Microbacterium*, *Cellulomonas* y *Arthrobacter* (Tabla 3). No obstante, las secuencias de las cepas ACPG 9 y 10 evidenciaron bajos porcentajes de identidad (87 y 89% respectivamente); para estos casos se asignó el género más próximo (*Cellulomonas*).

Tabla 2. Secuencias del gen 16S ARNr sugeridas por el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey's.

Cepa	Género	Número de acceso
ACPG 1	<i>Micrococcus</i>	EU005372
ACPG 2	<i>Streptomyces</i>	AB184574
ACPG 3	<i>Micrococcus</i>	AJ536198
ACPG 4	<i>Nocardiopsis</i>	X97883
ACPG 5	<i>Nocardiopsis</i>	AF360734
ACPG 6	<i>Microbacterium</i>	AB234028
ACPG 7	<i>Micrococcus</i>	FJ214355
ACPG 9	<i>Cellulomonas</i>	AB166887
ACPG 10	<i>Cellulomonas</i>	AY884570
ACPG 12	<i>Micrococcus</i>	DQ491453
ACPG 13	<i>Arthrobacter</i>	AJ243421
ACPG 14	<i>Streptomyces</i>	AJ621602
ACPG 17	<i>Cellulomonas</i>	X83799
ACPG 20	<i>Streptomyces</i>	AB249981

En el caso de las cepas ACPG 8, ACPG 11, ACPG 15, ACPG 16, ACPG 18 y ACPG 19, debido a la dificultad para obtener secuencias de buena calidad no fue posible su identificación molecular.

Posteriormente, se construyó un árbol de distancias con las secuencias de referencia. De acuerdo con los valores de identidad, las secuencias se agruparon con los géneros taxonómicos *Micrococcus*, *Streptomyces*, *Nocardiopsis*, *Microbacterium*, *Cellulomonas* y *Arthrobacter* (Figura 4).

Tabla 3. Resultados de las búsquedas mediante BlastN con las secuencias parciales del gen 16S ARNr.

Cepa	Género	Número de acceso	Identidad (%)
ACPG 1	<i>Micrococcus</i>	KJ575050	99
ACPG 2	<i>Streptomyces</i>	KF996505	99
ACPG 3	<i>Micrococcus</i>	KJ744024	100
ACPG 4	<i>Nocardiosis</i>	FJ898297	99
ACPG 5	<i>Nocardiosis</i>	KC856806	99
ACPG 6	<i>Microbacterium</i>	EU370408	99
ACPG 7	<i>Micrococcus</i>	AY159888	99
ACPG 9	<i>Cellulomonas</i>	JQ660195	89
ACPG 10	<i>Cellulomonas</i>	JQ660195	87
ACPG 12	<i>Micrococcus</i>	HM584233	99
ACPG 13	<i>Arthrobacter</i>	AY641537	93
ACPG 14	<i>Streptomyces</i>	EU384279	92
ACPG 17	<i>Cellulomonas</i>	JQ660195	97
ACPG 20	<i>Streptomyces</i>	AY641538	97

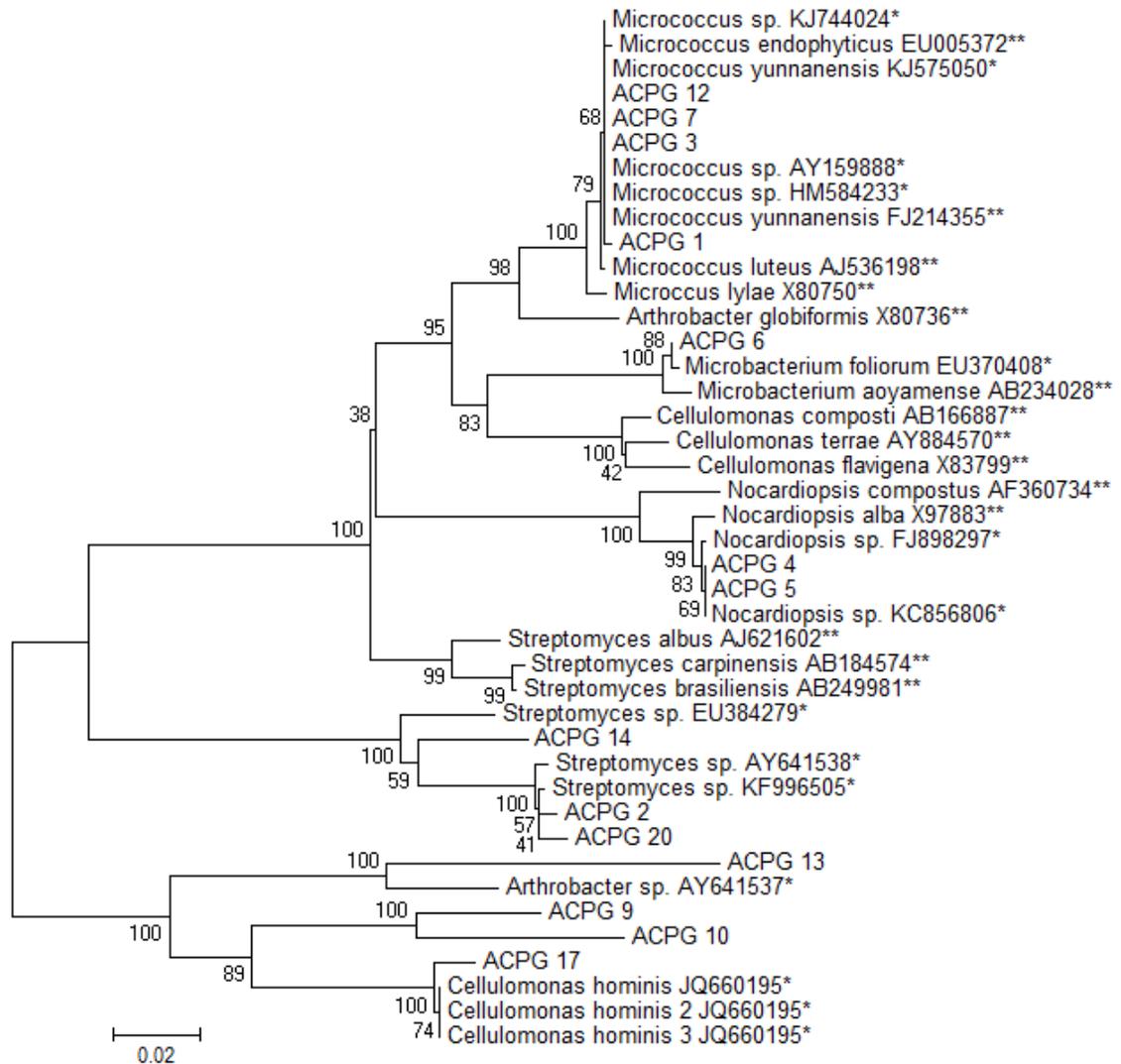


Figura 4. Árbol de distancias construido por el método Neighbor-Joining basado en secuencias parciales del gen 16S ARNr. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de Kimura 2 - parámetros y se encuentran en las unidades de serie de sustituciones de bases por sitio. El set de datos final incluyó 42 secuencias de nucleótidos, representados en 576 posiciones de las secuencias parciales del gen 16S ARNr de las cepas aisladas, y secuencias de referencia obtenidas del Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey's* y la base de datos del GenBank**. Los valores de *Bootstrap* fueron calculados con 1000 iteraciones y son mostrados en los nodos. Los análisis fueron construidos en la aplicación MEGA V6.

2.2. Caracterización morfológica de los cultivos axénicos

Los datos morfológicos obtenidos de los aislamientos confirmaron que pertenecen al filo Actinobacteria, todas Gram positivas y de morfología variable. De acuerdo con los géneros asignados en la determinación del gen 16S ARNr, los aislados fueron agrupados. A continuación se describen detalladamente los caracteres macro y microscópicos relacionados a cada género.

***Micrococcus* sp.**

Genero asignado a las cepas ACPG 1, 3, 7 y 12. A nivel microscópico cepas ACPG 1, 3 y 12 presentan células en forma de cocos solos o en pares, Gram positivas, con tamaño entre 0.5 a 1.0 μm , sin presencia de endosporas. En particular, la cepa ACPG 7 presenta células en forma de cocos solos o en pares, con tamaño entre 1.0 a 3.0 μm y Gram variables, siendo Gram negativos en cultivos jóvenes (3 - 5 días) y Gram positivos en cultivos viejos (más de 14 días), observándose cocos solos o en pares (Figura 5 A, D, G, J). Después de 14 días de incubación, en las cepas ACPG 3 y 12 se observaron micelios no fragmentados, algunos con agrupaciones celulares en las terminaciones (Figura 5 B, E, H, K).

A nivel macroscópico los aislados de este género morfología variable. Las cepas ACPG 1 y 7 fueron colonias grandes, de color rosado-amarillento, superficie planoconvexa, mucoides y brillantes, de forma irregular, aunque también se observan colonias redondeadas y de borde ondulado (Figura 5 C, I). La cepa ACPG 3 presentó colonias medianas, amarillas convexas, brillantes, de forma circular y borde redondeado (Figura 5 F). La cepa ACPG 12 presentó colonias blancas planoconvexas, opacas, de forma irregular y borde redondeado (Figura 5 L).

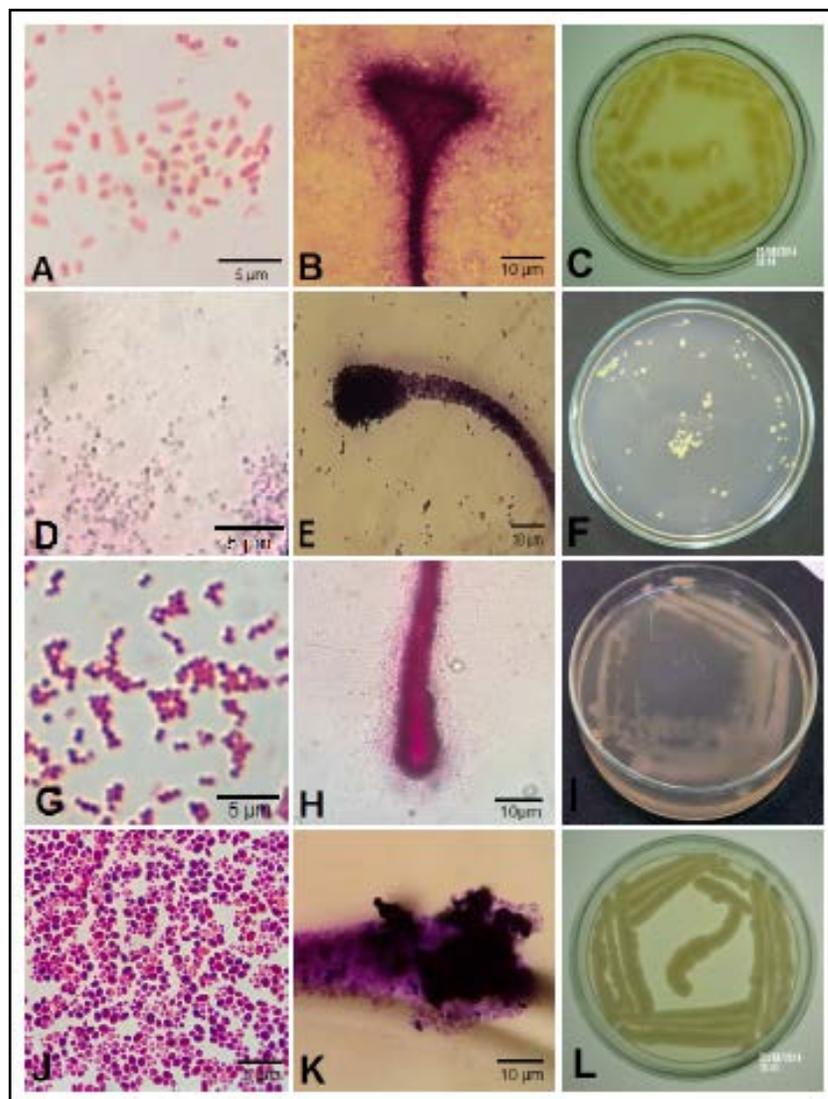


Figura 5. Características microbiológicas de las cepas aisladas del género *Micrococcus* (Cepas ACPG 1, 3, 7 y 12). Cepa ACPG 1. A) Cocos Gram positivos. B) Estructura micelar no fragmentada, 1000X. C) Apariencia en agar CYC luego de 3 días de incubación. Cepa ACPG 3. D) Cocos Gram positivos. E) Estructura micelar no fragmentada, 1000X. F) Cultivo en agar CYC, 3 días de incubación. Cepa ACPG 7. G) Cocos Gram positivos. H) Estructura micelar no fragmentada, 1000X. I) Apariencia en agar CYC luego de 14 días de incubación. Cepa ACPG 12. J) Cocos Gram positivos. K) Estructura micelar no fragmentada, 1000X. L) Apariencia en agar CYC luego de 14 días de incubación.

***Nocardiopsis* sp.**

Género asignado a las cepas ACPG 4 y 5. A nivel microscópico presentan células en forma de bacilos en pares o en agrupación estreptobacilar, Gram positivos, de 0.5 μm de ancho x 1.0 μm de largo (Figura 6 A y 6 E), micelio bien desarrollado y con ramificaciones pronunciadas (Figura 6 B y 6 F).

A nivel macroscópico presentan colonias pequeñas de forma irregular y bordes ondulados, en cultivos jóvenes colonias cremosas, planoconvexas y de color rosado pálido (3 - 5 días) en cultivos viejos (≥ 14 días) colonias blancas, superficie polvorienta (Figura 6 C, D, G, H).

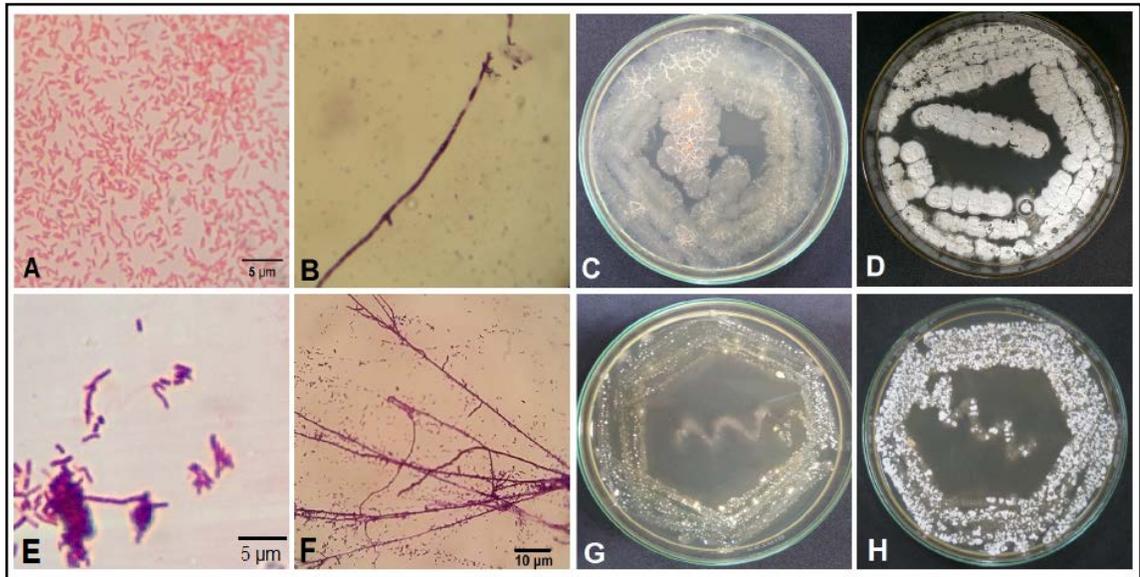


Figura 6. Características microbiológicas de las cepas aisladas del género *Nocardiopsis* (Cepas ACPG 4 y 5). Cepa ACPG 4. **A)** Bacilos Gram positivos. **B)** Micelio fragmentado, 1000X. **C)** Apariencia en agar CYC luego de 3 días de incubación. **D)** Apariencia en agar CYC luego de 14 días de incubación. Cepa ACPG 5. **E)** Bacilos Gram positivos. **F)** Micelio ramificado, 1000X. **G)** Apariencia en agar CYC luego de 3 días de incubación. **H)** Apariencia en agar CYC luego de 14 días de incubación.

***Microbacterium* sp.**

Género representados por una sola cepa, ACPG 6. A nivel microscópico presenta células en forma de bacilos delgados solos o en pares formando agrupaciones en V, Gram positivos, entre 0.5 - 0.8 μm de ancho x 1.5 - 2.0 μm de largo (Figura 7A), micelio con pocas ramificaciones primarias (Figura 7B). A nivel macroscópico, son colonias pequeñas de color amarillo translúcido, superficie convexa, mucoide y brillante, de forma fusiforme y circular, con bordes redondeados (Figura 7C).

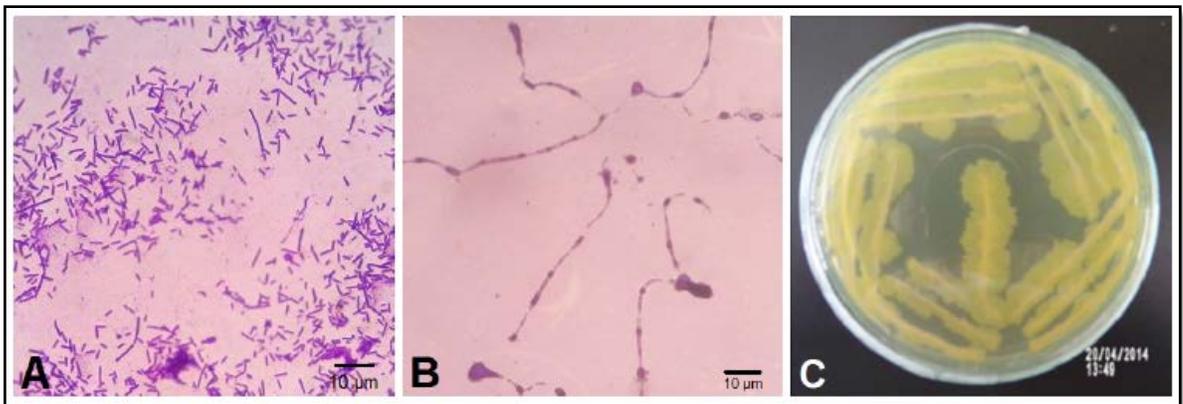


Figura 7. Características microbiológicas de las cepas aisladas del género *Microbacterium*. Cepa ACPG 6. A) Bacilos Gram positivos. B) Micelio ramificado, 1000X. C) Apariencia en agar CYC luego de 3 días de incubación.

***Arthrobacter* sp.**

Genero representado por una sola cepa, ACPG 13. A nivel microscópico presenta células en forma de bacilos solos o en pares formando agrupaciones en V. Cultivos jóvenes (1 día de incubación) Gram positivos, de 0.5 μm de ancho x 1.0 μm de largo. En cultivos con más de 3 días de incubación, se observó presencia de elementos bacilares y cocoidales (Figura 8 A). Micelio ramificado, no fragmentado, con presencia de cocos Gram positivos alrededor del micelio en formación (Figura 8B).

A nivel macroscópico, colonias grandes con bordes redondeados e irregulares, de color blanco - amarillento, superficie convexa, mucoide y brillante (Figura 8C).

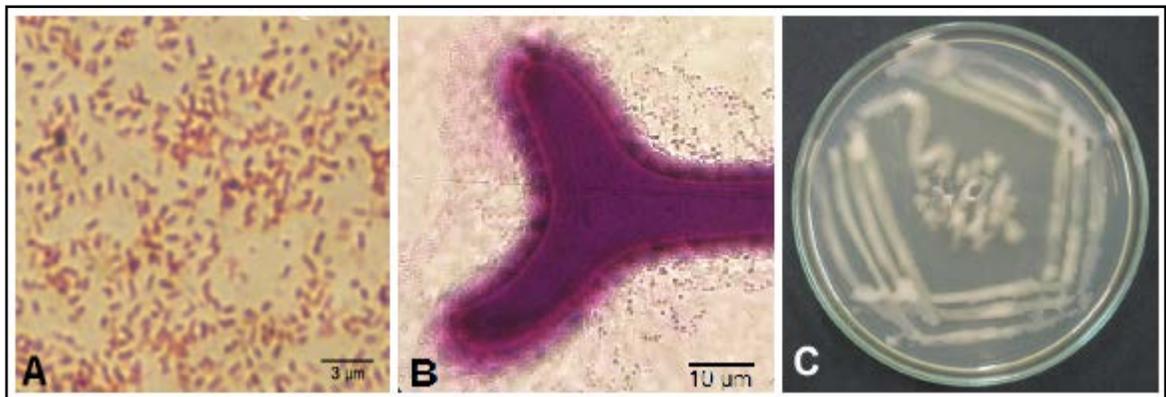


Figura 8. Características microbiológicas de las cepas aisladas del género *Arthrobacter*. Cepa ACPG 13. A) Elementos bacilares y cocoidales Gram positivos. B) Micelio no fragmentado de la cepa ACPG 13, 1000X. C) Apariencia en agar CYC luego de 14 d de incubación.

***Cellulomonas* sp.**

Género asignado preferiblemente a las cepas ACPG 9, 10 y 17. A nivel microscópico presentan células en forma de bacilos, algunos forman ángulos en forma de V, Gram positivos, con tamaño entre 0.5 μm de ancho x 1.5 μm de largo, sin formación de endosporas (Figura 9 A, D, G). Micelio fragmentado en elementos bacilares, en la cepa ACPG 9 (Figura 9 B), y un micelio ramificado en las cepas ACPG 10 y 17 (Figura 9 E y 9 H).

A nivel macroscópico, las cepas ACPG 9 y 10 presentan colonias pequeñas de color rosado pálido, superficie plana, rugosa y brillante, de forma irregular con borde ondulado (Figuras 9 C y 9 F). En particular, la cepa ACPG 17 presenta colonias pequeñas de color blanco amarillento, superficie umbilicada, opaca y rugosa, difícil de tomar del medio de cultivo sólido (Figura 9 I).

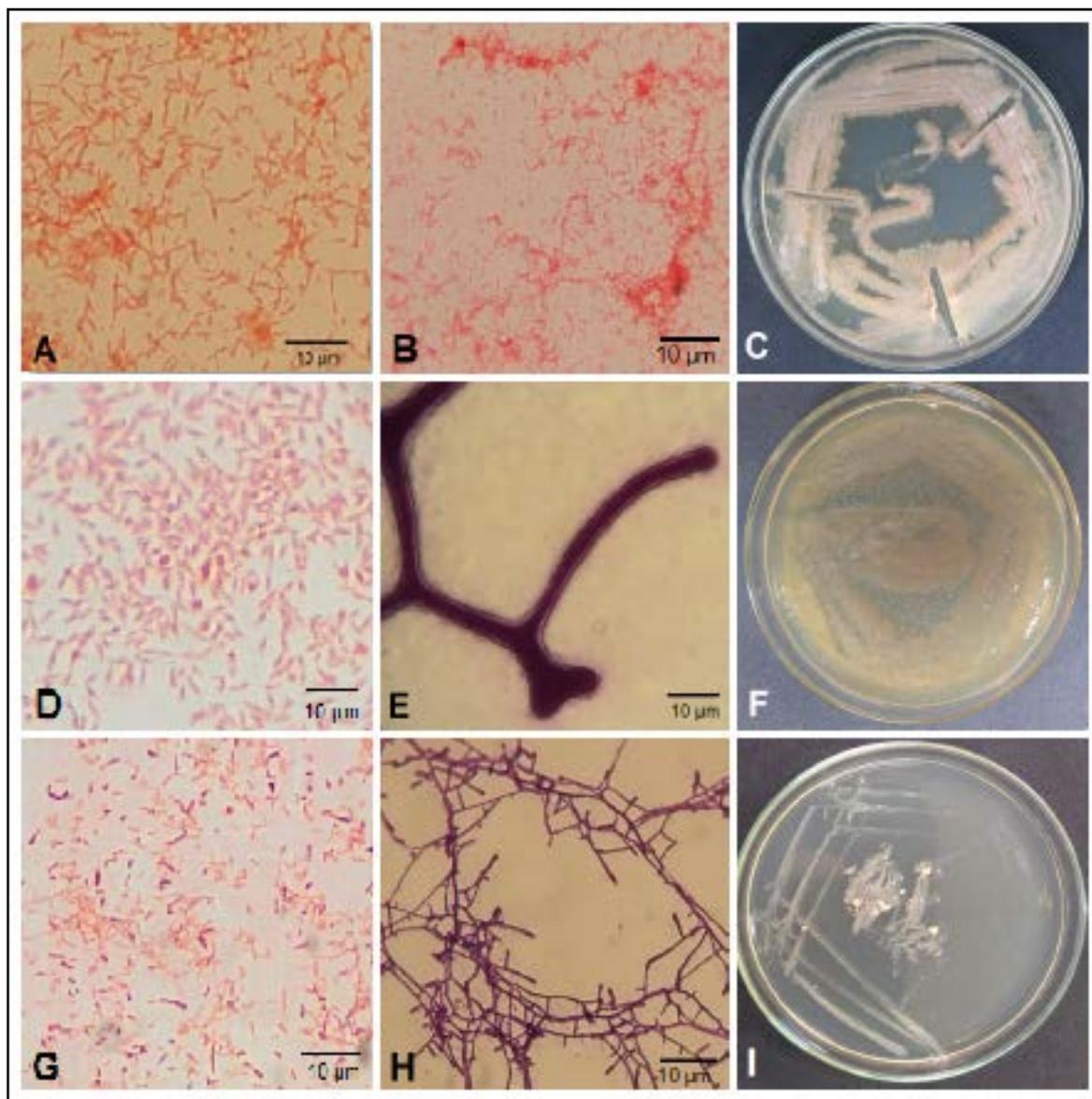


Figura 9. Características microbiológicas de las cepas aisladas del género *Cellulomonas* (Cepas ACPG 9, 10 y 17). Cepa ACPG 9. A) Bacilos Gram positivos. B) Micelio fragmentado, 1000X. C) Apariencia en agar CYC luego de 14 días de incubación. Cepa ACPG 10. D) Bacilos Gram positivos. E) Micelio ramificado, 1000X. F) Apariencia en agar CYC luego de 14 días de incubación. Cepa ACPG 17. G) Bacilos Gram positivos. H) Micelio ramificado y entramado, 1000X. I) Apariencia en agar CYC luego de 3 días de incubación.

***Streptomyces* sp.**

Género asignado a las cepas ACPG 2, 14 y 20, microscópicamente presentan células en forma de bacilos Gram positivos, de 0.5 μm de ancho x 1.0 μm de largo, en agrupación estreptobacilar (Figura 10 A, D, G). Desarrollo micelar muy ramificado, con formación de cadenas helicoidales como lo observado en la cepa ACPG 2 (Figura 10 B), presencia de conidios en la cepa ACPG 14 y ACPG 20 (Figura 10 E y 10 H).

A nivel macroscópico la cepa ACPG 2 fueron colonias inicialmente de color rosado claro y de superficie lisa, que de 3 a 5 días se cubrieron de colonias pequeñas de color blanco-amarillento, superficie umbilicada, rugosa y opaca, de forma circular y fusiforme, con bordes redondeados. La cepa ACPG 14 formaron colonias de color rosado claro y la cepa ACPG 20 formó pequeñas colonias convexas de color blanco, ambas de aspecto liso y opaco, de forma circular y fusiforme, con bordes redondeados (Figura 10 C, F, I).

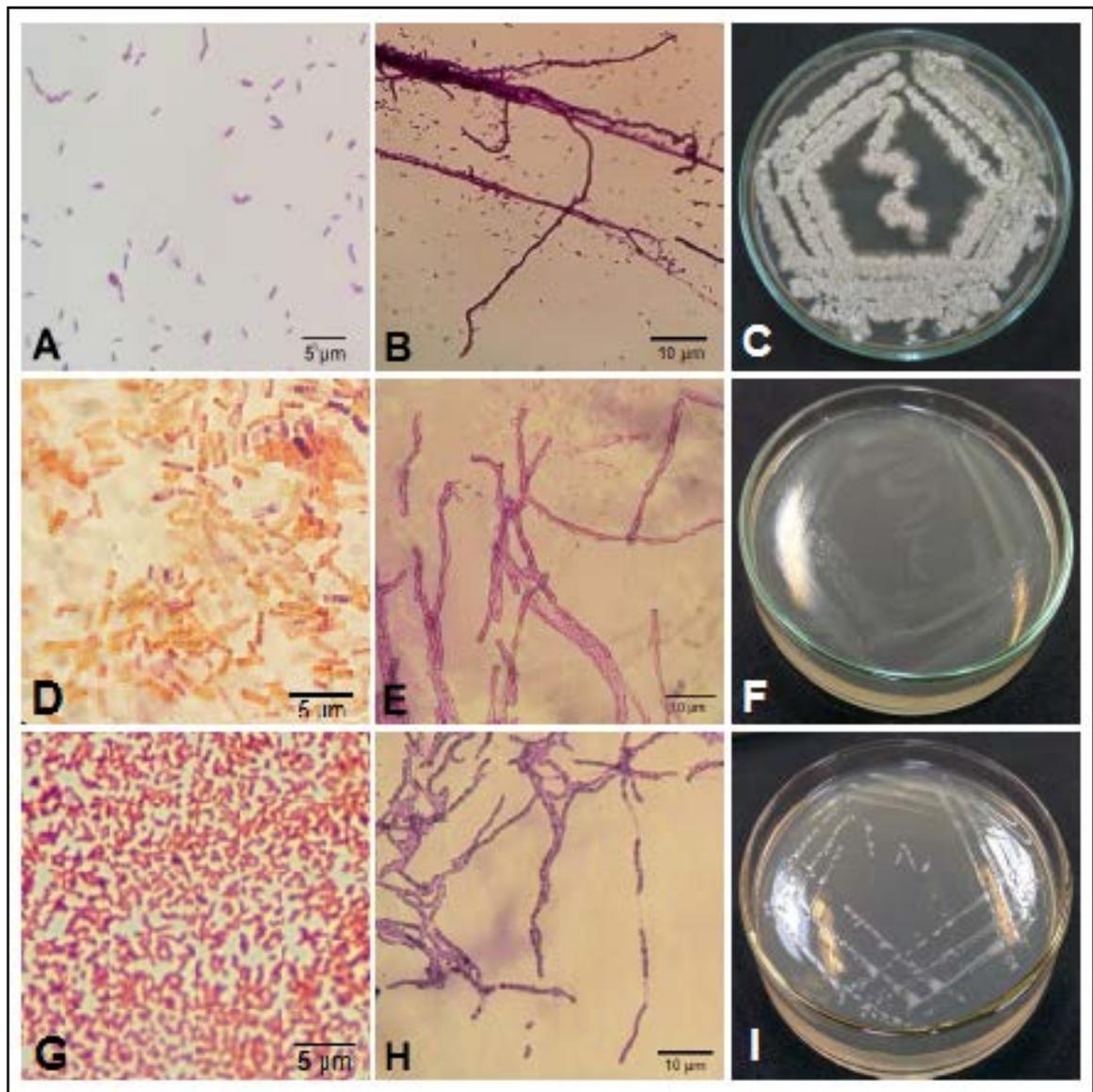


Figura 10. Características microbiológicas de las cepas aisladas del género *Streptomyces* (Cepas ACPG 2, 14 y 20). Cepa ACPG 2. A) Bacilos Gram positivos. B) Micelio en espiral, 1000X. C) Apariencia en agar CYC luego de 14 días de incubación. Cepa ACPG 14 D) Bacilos Gram positivos. E) Micelio con formación de conidios, 1000X. F) Apariencia en agar CYC luego de 3 días de incubación. Cepa ACPG 20 G) Bacilos Gram positivos. H) Micelio con formación de conidios, 1000X. I) Apariencia en agar CYC luego 5 días de incubación.

2.5. Identificación de actinobacterias

Mediante la combinación del análisis molecular basado en la secuenciación parcial del gen 16S ARNr y las características morfológicas de las colonias bacterianas, se logró la identificación de los microorganismos aislados a partir de compost de la BRA del café (Tabla 4). Se identificaron cepas del filo *Actinobacteria* representadas en 4 familias *Microbacteriaceae*, *Nocardiopsaceae*, *Micrococcaceae* y *Streptomycetaceae*, representados en 6 géneros *Microbacterium*, *Nocardiopsis*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Streptomyces*, *Corynebacterium* y *Cellulomonas*, siendo el género *Micrococcus* el que presentó la mayor prevalencia con 28,6%, seguido de *Cellulomonas* y *Streptomyces* con 21,5% cada uno, mientras que los otros géneros se aislaron en menor proporción, *Nocardiopsis* 14,3%, *Microbacterium* y *Arthrobacter* con 7,1% cada uno (Figura 11).

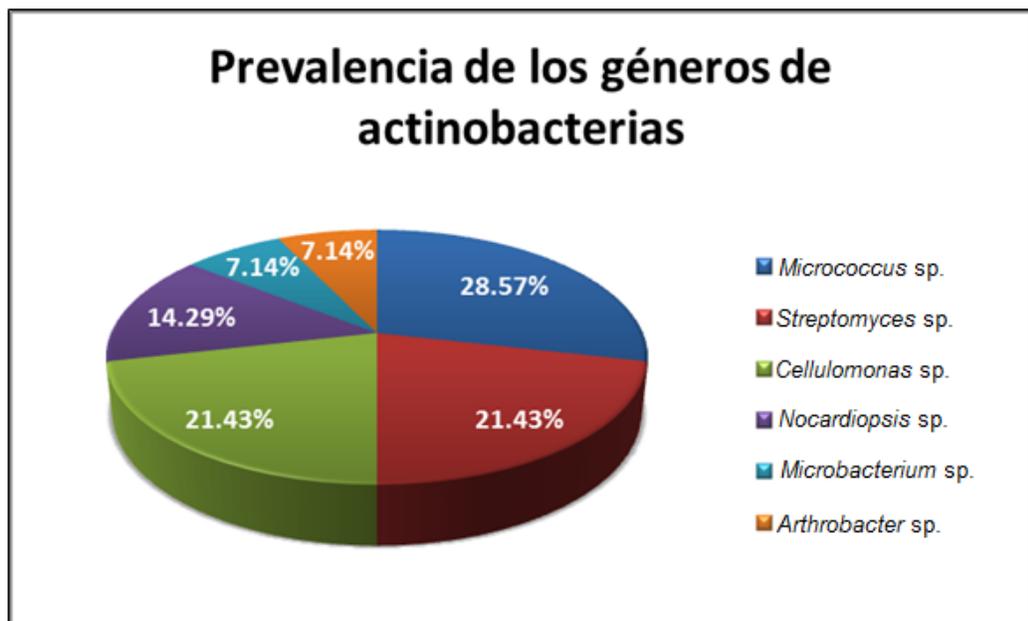


Figura 11. Prevalencia de géneros en el compost. Géneros de actinobacterias aisladas a partir del compost de la BRA del café.

Tabla 4: Consolidado de caracteres morfológicos y moleculares usados en la determinación taxonómica de las actinobacterias aisladas a partir de compost de la BRA del café. Abreviaturas: CMB-colonia mucoide y brillante, ARA-anverso rosado amarillento, RB-reverso beige, CGP-cocos Gram positivos, MNF-micelio no fragmentado, CRO-colonia rugosa y opaca, ABA-anverso blanco amarillento, BGP-bacilos Gram positivos, AEB-agrupación estreptobacilar, MR-micelio ramificado, CH-cadenas helicoidales, ARAM-anverso y reverso amarillo, CCO-colonias cremosas y opacas, ABP-anverso blanco polvoriento, ARAMT-anverso y reverso amarillo traslucido, AV-agrupación en V, MPR-micelio poco ramificado, CGV-cocos Gram variables, CRB-colonia rugosa y brillante, ARRC-anverso y reverso rosado claro, MF-micelio fragmentado, EB-elementos bacilares, CO-colonias opacas, ARBC-anverso y reverso beige claro, AB-anverso blanco, RBC-reverso beige claro, EBC-elementos bacilares y cocoidales, CLO-colonias lisas y opacas, PC-presencia de conidios, ARBL-anverso y reverso blanco.

Cepa	Características macroscópicas	Características microscópicas	Determinación molecular (%Identidad)
ACPG 1	CMB, ARA, RB	CGP, MNF	<i>Micrococcus</i> sp. (99%)
ACPG 2	CRO, ABA, RB	BGP, AEB, MR, CH	<i>Streptomyces</i> sp. (99%)
ACPG 3	CMB, ARAM	CGP, MNF	<i>Micrococcus</i> sp. (100%)
ACPG 4	CCO, ABP, RB	BGP, AEB, MR	<i>Nocardiopsis</i> sp. (99%)
ACPG 5	CCO, ABP, RB	BGP, AEB, MR	<i>Nocardiopsis</i> sp. (99%)
ACPG 6	CMB, ARAMT	BGP, AV, MPR	<i>Microbacterium</i> sp. (99%)
ACPG 7	CMB, ARA, RB	CGV, MNF	<i>Micrococcus</i> sp. (99%)
ACPG 9	CRB, ARRC	BGP, AV, MF, EB	<i>Cellulomonas</i> sp. (89%)
ACPG 10	CRB, ARRC	BGP, AV, MR	<i>Cellulomonas</i> sp. (87%)
ACPG 12	CO, AB, RBC	CGP, MNF	<i>Micrococcus</i> sp. (99%)
ACPG 13	CMB, ABA, RBC	BGP, EBC, MR	<i>Arthrobacter</i> sp. (93%)
ACPG 14	CLO, ARRC	BGP, AEB, MR, PC	<i>Streptomyces</i> sp. (92%)
ACPG 17	CRO, ABA, RB	BGP AV, MR	<i>Cellulomonas</i> sp. (97%)
ACPG 20	CLO, ARBL	BGP, AEB, MR, PC	<i>Streptomyces</i> sp. (97%)

3. DISCUSIÓN

En este trabajo, se logró el aislamiento de 20 cepas del filo *Actinobacteria* a partir de compost de la BRA del café. Teniendo en cuenta características microbiológicas y moleculares, se lograron determinar taxonómicamente 14 cepas correspondientes a los géneros *Microbacterium*, *Nocardiopsis*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Streptomyces* y *Cellulomonas*.

Los resultados obtenidos evidencian una mayor diversidad de géneros de *Actinobacteria* en relación a lo reportado en estudios realizados sobre la composición microbiológica durante el proceso de compostaje a partir de la pulpa de café y de la pulpa de café mezclada con mucílago (Blandón *et al.*, 1998; Blandón *et al.*, 1999; Escobar *et al.*, 2012).

Adicionalmente, en este trabajo, se evidenció la presencia de los géneros, *Nocardiopsis*, *Cellulomonas* y *Microbacterium*. Es probable que la presencia de nuevos géneros esté relacionado con la composición específica del compost, el progreso de los parámetros fisicoquímicos y los materiales que se utilizan para su fabricación, que en este caso, corresponden a residuos de una finca con un sistema de cultivo orgánico (Ashraft *et al.*, 2007; Rebollido *et al.*, 2008).

Para las cepas ACPG 8, 11, 15, 16, 18 y 19, debido a la baja calidad de la secuencia no fue posible su identificación molecular, probablemente debido a que los oligonucleótidos no son específicos (Janda & Abbott, 2007).

El propósito de este estudio era aislar e identificar cepas de actinobacterias de una muestra de compost, en el marco de un macroproyecto que pretende evaluar la producción de hidrógeno molecular en este grupo bacteriano.

Las cepas obtenidas se usarán en la siguiente etapa del proyecto, es decir, la estimación de su potencial en la producción de hidrógeno. Para los aislados que presenten una producción de hidrógeno relevante para los propósitos del macroproyecto, se recomienda aplicar pruebas bioquímicas que ratifiquen la determinación taxonómica obtenida en este trabajo.

4. CONCLUSIONES

En este Trabajo de Grado se obtuvieron 20 aislados de actinobacterias a partir de compost de BRA de un cultivo de café orgánico de la Hacienda 'El Roble' (Los Santos – Santander). Se lograron identificar taxonómicamente 14 cepas mediante los métodos previamente seleccionados, a saber las características morfológicas y las secuencias parciales del gen 16S ARNr. Las 6 cepas restantes quedaron sin identificar, aunque se hizo una atribución preliminar de género. Por consiguiente, esta determinación debe repetirse mejorando las condiciones de amplificación y secuenciación. Todas las 20 cepas se encuentran criopreservadas por triplicado en el cepario del CINBIN.

Los 6 aislados pertenecen a géneros del filo *Actinobacteria*, del cual *Micrococcus* sp es el más abundante (~29%). Este resultado demostró la eficiencia de los medios de cultivo empleados, en cuanto a su selectividad.

Este es el primer reporte de actinobacterias presentes en compost a partir de la BRA del café orgánico. En contraste con más de 10 estudios previos realizados en compost a partir de BRA de cultivos convencionales (CENICAFÉ), se evidenció la presencia de tres géneros propios: *Microbacterium*, *Cellulomonas* y *Nocardiopsis*.

Las 20 cepas quedaron criopreservadas en el cepario del LBM de la Escuela de Biología y están disponibles para evaluación la producción de H₂ y de otras propiedades que se puedan considerar en el futuro.

5. RECOMENDACIONES

Llevar a cabo la amplificación por PCR de las cepas de actinobacterias encontradas en este trabajo a partir de compost de la BRA de café, con *primers* específicos para el gen 16S ARNr de las actinobacterias, con el fin de identificarlas a nivel de especie.

Hacer la caracterización bioquímica (pigmentos difusibles al medio, actividad biológica, composición lipídica de la pared celular), de las cepas de actinobacterias, con el fin de complementar la descripción morfológica y la identificación molecular de cada una de las cepas encontradas en el compost de la BRA de café.

BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA, E., GÓMEZ, E., ROMERO, M., CADAVID, G. & MORENO, C. Identificación molecular de poblaciones bacterianas asociadas al caracol pala (*Strombus gigas*) del caribe colombiano. *Acta Biológica Colombiana*, Julio, 2009, vol. 14, No, 2, p. 83-96.

ADAMS, J. & FROSTICK, L. Investigating microbial activities in compost using mushroom (*Agaricus bisporus*) cultivation as an experimental system. *Bioresource Technology*, February, 2007, vol. 99, p. 1097-1102.

ADEGUNLOYE, D. & ADETUYI, F. Composting of food wastes using cow and pig dung as booster. *European Journal of Applied Sciences*, 2009, vol. 1, No. 3, p. 34-39.

ADEGUNLOYE, D., ADETUYI, F., AKINYOSOYE, F. & DOYENI, M. Microbial analysis of compost using cowdung as booster. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2007, vol. 6, No. 5, p. 506-510.

ALTSCHUL, S., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. & LIPMAN, D. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, May, 1990, vol. 215, p. 403-410.

ARRIETA, O., RIVERA, A., ARIAS, L., ROJANO, B., RUIZ, O. & CARDONA, S. Biorremediación de un suelo con diésel mediante el uso de microorganismos autóctonos. *Revista Gestión y Ambiente*, Abril, 2012, vol. 15, No. 1, p. 27-40.

ASHRAFT, R., SHAHID, F. & ALI, T. Association of fungi, bacteria and actinomycetes with different compost. *Pakistan Journal of Botanic*, 2007, vol. 39, No. 6, p. 2141-2151.

AUSUBEL, F., BRENT, R., KINGSTON, R., MOORE, D., SEIDMAN, J., SMITH, J., & STRUHL, K. *Short protocols in molecular biology: a compendium of methods*

from current protocols in molecular biology. New York: Greene Pub. Associates, 1992, p. 232.

BLACKWOOD, C., OAKS, A. & BUYER, J. Phylum- and class- specific PCR primers for general microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, June, 2005, vol. 71, No. 10, p. 6193-6198.

BLANDÓN, G., RODRÍGUEZ, N. & DÁVILA, M. Caracterización microbiológica y físico-química de los subproductos del beneficio del café en proceso de compostaje. *Cenicafé*, 1998, vol. 49, No. 3, p. 169-185.

BLANDÓN, G., RODRÍGUEZ, N. & DÁVILA, M. Caracterización microbiológica y físico-química de la pula de café sola y con mucílago en proceso de lombricompostaje. *Cenicafé*, 1999, vol. 50, No. 1, p. 5-23.

CAMACHO, A., MARTÍNEZ, L., RAMÍREZ, H., VALENZUELA, R. & VALDÉS, M. Potencial de algunos microorganismos en el compostaje de residuos sólidos. *Terra Latinoamericana*, Agosto, 2014, vol. 32, No. 4, p. 291-300.

CERDÁ, E. Energía obtenida a partir de biomasa. *Cuadernos Económicos de ICE*, 2012, vol. 83, p. 117-140.

CHALLIS, G. & HOPWOOD, D. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – PNAS, 2003, vol. 100, No. 2, p. 14555-14561.

CORREDOR, P., ANDRADE, E., TOHME, J., DUQUE, M. & FLÓREZ, C. Abundancia y diversidad de las comunidades de *Streptomyces* en seis coberturas vegetales de la franja cafetera del Quindío, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 2000, vol. 5, No. 2, p. 59-69.

CROSS, T. & ATTWELL, R. Recovery of viable thermoactinomycete endospores from deep mud cores. En: McCarthy, A. & Cross, T. A taxonomic study of *Thermomonospora* and other monosporic actinomycetes. Journal of General Microbiology, 1984, vol. 130, p. 5-25.

CRUZ, N., CASTELLANOS, D. & ARGÜELLO, H. Degradación de celulosa y xilano por microorganismos aislados de dos tipos de compost de residuos agrícolas en la sabana de Bogotá. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas, 2009, vol. 3, No. 2, p. 237-248.

DE LA ROSA, S. & GAMBOA, M. Microorganismos acuáticos: una farmacia por visitar. Ciencia ergo sum, Julio-Octubre, 2004, vol. 11, No. 2, p. 186-190.

ESCOBAR, N., MORA, J. & ROMERO, N. Identificación en poblaciones microbianas en compost de residuos orgánicos de fincas cafeteras de Cundinamarca. Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural, 2012, vol. 16, No. 1, p. 75-88.

ESCOBAR, N., MORA, J. & ROMERO, N. Dinámica microbiológica en abonos obtenidos a partir de residuos orgánicos de fincas cafeteras. Revista Agronomía, Septiembre, 2013, vol. 21, No. 2, p. 29-39.

EVANGELISTA, Z. & MORENO, A. Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos. BioTecnología, México D.F., 2007, vol. 11, No. 3, p. 37-50.

FENICAL, W. & JENSEN, P. (2006). Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. Nature Chemical Biology, 2006, vol. 2, No. 12, p. 666-673.

GBOLAGADE, J. Bacteria associated with compost used for cultivation of Nigerian edible mushrooms *Pleurotus tuber-regium* (Fr.), and *Lentinus squarrosulus* (Berk.). African Journal of Biotechnology, February, 2006, vol. 5, No. 4, p. 338-342.

GODINHO, A. & BHOSLE, S. Carotenes produced by alkalophilic orange-pigmented strain of *Microbacterium arborescens* – AGSB isolated from coastal sand dunes. Indian Journal of Marine Sciences, September, 2008, vol. 37, No. 3, p. 307-312.

GOODFELLOW, M., KÄMPFER, P., BUSSE, H., TRUJILLO, M., SUZUKI, K., LUDWIG, W. & WHITMAN, W. Bergey's manual of systematic bacteriology: the actinobacteria, part A. New York.: Springer, 2012. p. 5.

GOODFELLOW, M. & WILLIAMS, S. Ecology of actinomycetes. Annual Reviews Microbiology, 1983, vol. 37, p.189-216.

GREENBLATT, C., BAUM, J., KLEIN, B., NACHSHON, S., KOLTUNOV, V. & CANO, R. *Micrococcus luteus* – Survival in amber. Microbial Ecology, May, 2004, vol. 48, p. 120-127.

GUO, X., XIA, X., TANG, R. & WANG, K. Real – time PCR quantification of the predominant bacterial divisions in the distal gut of Meishan in Landrace pigs. Anaerobe, June, 2008, vol. 14, p. 224-228.

HEUER, H., KRSEK, M., BAKER, P., SMALLA, K. & WELLINGTON, E. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of gene encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. Applied and Environmental Microbiology, August, 1997, vol. 63, No. 8, p. 3233-3241.

HUBER, T., FAUKNER, G. & HUGENHOLTZ, P. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics*, April, 2004, vol. 20, No. 14, p. 2317- 2319.

KUDDUS, M., ROOHI, S. & AHMAD, I. Cold-active extracellular α -amylase production from novel bacteria *Microbacterium foliorum* GA2 and *Bacillus cereus* GA6 isolated from Gangotri glacier, western Himalaya. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, April, 2012, vol. 10, p. 151-159.

LI, X. *Streptomyces cellulolyticus* sp. nov., a new cellulolytic member of the genus *Streptomyces*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, April, 1997, vol. 47, No. 2, p. 443-445.

LOMAS, E., URBANO, C., MERINO, J. & CAMARERO, L. Valorización de la biomasa en el país vasco. Bilbao: Ente Vasco de la Energía, 2001. p. 1-89.

LUDWIG, W., & SCHLEIFER, K. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 1994, vol. 15, No. 2, 155-173.

LUGIOYO, G., CABRERA, D., MIRAVET, M., NÚÑEZ, R., DELGADO, Y., CABRERA, H & MARTÍ, J. Identificación y detección de la actividad antimicrobiana de cepas de bacterias aisladas de la zona exclusiva económica al sur de Cuba. *Serie Oceanológica*, 2003, vol. 1, p. 59-67.

LYND, L., WEIMER, P., VAN ZYL, W. & PRETORIUS, I. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, September, 2002, vol. 66, No. 3, p. 506-577.

MAGARVEY, N., KELLER, J., BERNAN, V., DWORKIN, M. & SHERMAN, D. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Applied and Environmental Microbiology*, December, 2004, vol. 70, No. 12, p. 7520-7529.

MARTIN, F., MARTI, R., WAGLECHNER, N., WRIGHT, G. & TOPP, E. Draft genome sequence of the sulfonamide antibiotic-degrading *Microbacterium* sp. strain C448. *Genome Announcements*, February, 2014, vol. 2, No. 1, p. 1-2.

MCKENDRY, P. Energy production from biomass (part 2): conversion technologies. *Bioresource Technology*, July, 2002, vol. 83, p. 47-54.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL - MADR. Anuario estadístico del sector agropecuario y pesquero 2011. Resultados evaluaciones agropecuarias municipales. Bogotá D.C.: Edición Dirección de Política Sectorial – Grupo Sistemas de Información, 2012, p. 1-205.

MINISTERIO DE MINAS Y ENERGÍA DE LA REPÚBLICA DE COLOMBIA. – MINMINAS. Atlas del potencial energético de la biomasa residual en Colombia. Bucaramanga: Ediciones Universidad Industrial de Santander, 2011, p. 1-180.

MONODANE, T., KAWABATA, Y., YANG, S., HASE, S. & TAKADA, H. Induction of necrosis factor- α and interleukin-6 in mice *in vivo* and in murine peritoneal macrophages and human whole blood cells *in vitro* by *Micrococcus luteus* teichuronic acids. *Journal of Medical Microbiology*, May, 2001, vol. 50, p. 4-12.

PÉREZ, N. Evaluación de la actividad antimicrobiana y citotóxica de metabolitos secundarios producidos por actinomicetos aislados de suelos colombianos. Trabajo de grado. Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana, 2010, p. 1-37.

PIERRE, F., ROSELL, M. & QUIROZ, A. El compostaje de la pulpa de café como alternativa para los caficultores. INIA HOY, 2009, vol. 6, p.183-190.

PINTO, S., MANN, M., CAMPOS, F., FRANCO, A., GERMANI, J. & VAN DER SAND, S. Preliminary characterization of some *Streptomyces* species isolated from a composting process and their antimicrobial potential. World Journal Microbiology and Biotechnology, 2010, vol. 26, p. 1847-1856.

RAMÍREZ, N., SANDOVAL, A. & SERRANO, J. Las bacterias y sus aplicaciones biotecnológicas. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, Enero, 2004, vol. 24, No. 1, p. 1-24.

REBOLLIDO, R., MARTÍNEZ, J., AGUILERA, Y., MELCHOR, K., KOERNER, I. & STEGMANN, R. Microbial populations during composting process of organic fraction of municipal solid wasted. Applied Ecology and Environmental Research, March, 2008, vol. 6, No. 3, p. 61-67.

REVOLLO, E., SERNA, O. & HERNÁNDEZ, J. Caracterización de actinobacterias raras, degradadoras de lignocelulosa: Demostración de la actividad lacasa en dos aislados de *Tsukamurella* sp. y *Cellulosimicrobium* sp. Revista Colombiana de Biotecnología, Diciembre, 2012, vol. 14, No. 2, p. 70-80.

ROBERT, E. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research, February, 2004, vol. 32, No. 5, p. 1792-1797.

SAITOU, N., & NEI, M. The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 1987, vol. 4, No. 4, p. 406-425.

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. Molecular cloning: a laboratory manual. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, p. 1982-1983.

SARMIENTO, A. Producción de antitumorales y antibióticos en actinomicetos aislados de arrecifes coralinos del Cañón de Avilés y algas submareales del mar Cantábrico. Trabajo de Maestría. Asturias: Universidad de Oviedo e Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias, 2014, p. 1-131.

SCHAEFFER, A. & FULTON, M. A simplified method of staining endospores. Science, 1933, vol. 77, p. 194.

SEMÊDO, L., GOMES, R., LINHARES, A., DUARTE, G., NASCIMENTO, R., ROSADO, A., MARGIS, M., MARGIS, R., SILVA, K., ALVIANO, C., MANFIO, G., SOARES, R., LINHARES, L. & COELHO, R. *Streptomyces drozdowiczii* sp. Nov., a novel cellulolytic streptomycete from soil in Brazil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, February, 2004, vol. 54, p. 1323-1328.

SERRANO, J. & LUQUE, R. Biocombustibles líquidos: procesos y tecnologías. Anales de la Sociedad Española de Química, Octubre, 2011, vol. 107, No. 4, p. 383-389.

SHOU, T., XIANG, P., GUOYONG, L., LI, Z., LI, X., WEN, L. & YINGGANG, L. Isolation and characterization of new *p*-terphenyls with antifungal, antibacterial and antioxidant activities from halophilic actinomycete *Nocardiosis gilva* YIM 90087. Journal of Agricultural and Food Chemistry, February, 2013, vol. 61, p. 3006-3012.

STACKEBRANDT, E. & GOEBEL, B. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in

bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, October, 1994, vol. 44, No. 4, p. 846-849.

STEGER, K., SJÖGREN, A., JARVIS, A., JANSSON, J. & SUNDH, I. Development of compost maturity and Actinobacteria populations during full-scale composting of organic household waste. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03271.x

SUZUKI, S. & HENDERSON, P. The hydantoin transport protein from *Microbacterium liquefaciens*. *Journal of Bacteriology*, May, 2006, vol. 188, No. 9, p. 3329-3336.

TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A. & KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, October, 2013, vol. 30, p. 2725-2729.

TIQUIA, S. Evolution of extracellular enzyme activities during manure composting. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, vol. 92, p. 764-775.

TUOMELA, M., VIKMAN, M., HATAKKA, A. & ITÄVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology*, 2000, vol. 72, No. 2, p. 169-183.

WANG, Y., ZHANG, Z., RUAN, J., WANG, Y. & ALI, S. Investigation of actinomycete diversity in the tropical rainforests of Singapore. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, June, 1999, vol. 23, No. 3, p. 178-187.

WIRTH, R., KOVÁCS, E., MARÓTI, G., BAGI, Z., RÁKHELY, G., & KOVÁCS, K. L. Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next

generation DNA sequencing. *Biotechnology for Biofuels*, 2012, vol. 5, No. 1, p. 41-57.

YANG, S., SUGAWARA, S., MONODANE, T, NISHIJIMA, M., ADACHI, Y., AKASHI, S., MIYAKE, K., HASE, S. & TAKADA, H. *Micrococcus luteus* teichuronic acids activated human and murine monocytic cells in a CD14- and toll-like receptor 4-dependent manner. *Infection and Immunity*, April, 2001, vol. 69, No.4, p. 2025-2930.