

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ACTINOBACTERIAS CULTIVABLES
DE 'AGUAS MIEL' EN UN SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE CAFÉ ORGÁNICO
(RESIDUO POST-COSECHA)**

MARÍA FERNANDA SÚA ROJAS

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

BUCARAMANGA

2015

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ACTINOBACTERIAS CULTIVABLES
DE 'AGUAS MIEL' EN UN SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE CAFÉ ORGÁNICO
(RESIDUO POST-COSECHA)**

MARÍA FERNANDA SÚA ROJAS

Trabajo de Grado para optar al título de Bióloga

Tutor

JORGE HERNÁNDEZ TORRES, PhD.

Co-Tutor

Oriana Danuta Serna Daza, Bióloga

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

BUCARAMANGA

2015

AGRADECIMIENTOS

A *Dios* por ser mi guía constante en este larga travesía de subidas y bajadas del cual salí vencedora.

A mi madre *Mireya Rojas* por enseñarme la fortaleza de la mujer independiente y la perseverancia para lograr mis metas, por dedicar tantos sacrificios a este reto. Gracias mami!

A mi padre *Cesar Miguel Súa* por estar presente de una u otra manera pese las circunstancias, Gracias papito!

A mi *abuelita Angela Arias* y *tía Milder Rojas*, por ser un apoyo constante en todo este proceso, por brindarme amor y comprensión. Las quiero mucho!

A mi hermana *Laura Marcela Súa* por las alegrías y el acompañamiento cuando lo necesitaba. Te quiero mucho!

A mi *Cuchus* por su amistad sincera, su apoyo incondicional, por las alegrías, los sueños, la fortaleza brindada cuando más lo necesitaba y por estar allí hasta el último momento. Te quiero mucho!

A todos mis amigos de risas y estudios, en especial a *Jhonner Rueda* por su amistad sincera pese las situaciones y la distancia.

Al profesor *Jorge Hernández* por la oportunidad brindada de construir y culminar mi camino como bióloga a su lado, por ser ejemplo de inspiración al amar lo que hace como profesional.

A *Oriana Serna* por todo el apoyo brindado durante mi pasantía de grado, por el conocimiento y las experiencias enseñadas en el CINBIN. Por las palabras de aliento cuando más las necesitaba, por su acompañamiento en todo momento.

A la *Vicerrectoría de Investigación y Extensión* de la UIS por el financiamiento otorgado para la ejecución de este proyecto de grado.

A los señores *Oswaldo Acevedo* y *Fermín Alba*, de la Hacienda “El Roble” por los recursos dispuestos para los análisis realizados en este trabajo.

CONTENIDO

| | pág. |
|--|-------------|
| INTRODUCCIÓN | 12 |
| 1. MATERIALES Y MÉTODOS | 17 |
| 1.1 TOMA DE MUESTRAS | 17 |
| 1.2 AISLAMIENTO PRIMARIO | 17 |
| 1.3 INDIVIDUALIZACIÓN DE CEPAS DE ACTINOBACTERIAS | 18 |
| 1.4 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE CULTIVOS AXÉNICOS | 18 |
| 1.4.1 Caracterización macroscópica | 18 |
| 1.4.2 Caracterización microscópica | 18 |
| 1.5 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ACTINOBACTERIAS | 19 |
| 1.5.1 Extracción de ADN total | 19 |
| 1.5.2 Electroforesis en gel de agarosa | 19 |
| 1.6 AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN 16S rRNA Y SECUENCIACIÓN | 19 |
| 1.6.1 Purificación de ADN y obtención de secuencias | 20 |
| 1.7 ANÁLISIS DE SECUENCIAS DEL GEN 16S rRNA | 20 |
| 1.7.1 Matrices y árboles de distancia | 21 |
| 1.8 CRIOPRESERVACIÓN DE CULTIVOS | 21 |
| 2. RESULTADOS | 22 |

| | |
|---|-----------|
| 2.1 AISLAMIENTO DE ACTINOBACTERIAS Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE CULTIVOS AXÉNICOS | 22 |
| 2.2 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ACTINOBACTERIAS | 44 |
| 2.3 CRIOPRESERVACIÓN DE CULTIVOS | 51 |
| 3. DISCUSIÓN | 52 |
| 4. CONCLUSIONES | 55 |
| 5. RECOMENDACIONES | 56 |
| BIBLIOGRAFÍA | 57 |

LISTA DE TABLAS

| | pág. |
|---|------|
| Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación parcial del gen 16S rRNA. | 20 |
| Tabla 2. Asignación taxonómica de las cepas del phylum <i>Actinobacteria</i> aisladas de 'aguas miel' con base en alineamientos BlastN del gen 16S rRNA. | 46 |
| Tabla 3. Secuencias de referencia tomadas de Bergey's (2012). | 47 |
| Tabla 4. Determinación taxonómica de las cepas del phylum <i>Actinobacteria</i> aisladas de 'aguas miel' con base en caracterización morfológica y molecular del gen 16S rRNA. | 50 |

LISTA DE FIGURAS

| | pág. |
|--|-------------|
| Figura 1. Ubicación del sitio de muestreo. | 17 |
| Figura 2. Gel 0.8% agarosa de extractos de ADN total de las cepas aisladas. | 44 |
| Figura 3. Gel 0.8% agarosa de amplificadores parciales del gen 16S rRNA. | 45 |
| Figura 4. Árbol de distancia inferido a partir de secuencias del gen 16S rRNA de cepas de <i>Actinobacteria</i> . | 49 |
| Figura 5. Distribución de actinobacterias identificados con base en el gen 16S rRNA y características morfológicas. | 51 |

RESUMEN

TITULO: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ACTINOBACTERIAS CULTIVABLES DE 'AGUAS MIEL' EN UN SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE CAFÉ ORGÁNICO (RESIDUO POST-COSECHA)*.

AUTORES: SUA ROJAS, María Fernanda**

PALABRAS CLAVE: *Actinobacteria*, residuos cafeteros, 'aguas miel', contaminación ambiental, gen 16S rRNA.

DESCRIPCIÓN:

La industria cafetera en Colombia, ocupa uno de los primeros campos económicos, con una producción anual que alcanzó 12.1 millones de sacos de 60 kg en el 2014. No obstante, se considera como una de las industrias más contaminantes del mundo, desechando cerca de 5 L de agua residual por kg de café pergamino. Las aguas residuales del beneficio o 'aguas miel', son sustratos orgánicos complejos en cuya degradación participan bacterias del phylum *Actinobacteria*, con alto potencial biotecnológico para la producción de antibióticos, agentes antitumorales, agentes inmunosupresores, enzimas y gases combustibles. El objetivo de este trabajo fue caracterizar, mediante técnicas microbiológicas y moleculares, actinobacterias aisladas de piscinas de tratamiento de mucilago de un cultivo cafetero orgánico calidad *Premium*, de la Mesa de los Santos (Santander). Se hizo identificación preliminar mediante el análisis de características microbiológicas, complementada con alineamientos de secuencias del gen 16S rRNA. Se aislaron e identificaron 21 cepas de actinobacterias, entre ellas, los géneros *Micrococcus*, *Gordonia*, *Leifsonia*, *Arthrobacter* y *Streptomyces*, siendo este último el más representativo (67%). Los resultados obtenidos aportan nuevo conocimiento sobre la composición de la comunidad de actinobacterias en el residuo cafetero 'aguas miel'. Las cepas aisladas y caracterizadas serán empleadas para la posterior evaluación de su potencial en la producción de H₂ y la caracterización de isoformas de oxidasas multicobre bacterianas.

*Trabajo de grado modalidad Pasantía de investigación

**Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Director: Jorge Hernández Torres, PhD. y Co-tutor: Oriana Danuta Serna, Bióloga.

ABSTRACT

TITLE: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ACTINOBACTERIA FROM COFFE WASTE WATER OF ORGANIC COFFEE CROP*.

AUTHORS: SUA ROJAS, María Fernanda**

KEY WORDS: *Actinobacteria*, coffee wastewater, environmental contamination, 16S rRNA gene.

DESCRIPTION:

Coffee industry represents one of the major constituents of the Colombian agro-industry, with an annual production reaching 12.1 million of 60 kg bags, in 2014. However, the production of coffee is considered one of the more pollutant industries in the world: about 5 L of wastewater per kg of parchment coffee are discarded. Wastewaters of coffee production are complex organic substrates; the *phylum Actinobacteria* is involved in the biodegradation of such compounds and exhibit a high biotechnological potential for the production of antibiotics, antitumor agents, immunosuppressive agents, enzymes and fuel gases. The aim of this study was to characterize, by microbiological and molecular techniques, actinobacteria isolated from slime pools of an organic coffee processing factory, from Mesa de los Santos (Santander). Preliminary, the identification was made by analyzing microbiological characteristics, complemented with sequence alignments of 16S rRNA gene. We isolated and identified 21 actinobacteria strains, including *Micrococcus*, *Gordonia*, *Leifsonia*, *Arthrobacter* and *Streptomyces* genera, this latter being the most representative (67%). Our findings provide new insights into the composition of the *Actinobacteria* community of the coffee residues or wastewaters. The isolated strains could be used for further evaluation of their potential in the production of H₂ and the search of bacterial multicopper oxidase isoforms.

*Degree work, Research internship.

**Science faculty, Department of Biology. Director: Jorge Hernández Torres, PhD. and Co-tutor: Oriana Danuta Serna, Bióloga.

INTRODUCCIÓN

En Colombia, la producción y el comercio de café ocupan uno de los primeros campos económicos, con una producción anual que alcanzó 12.1 millones de sacos de 60 kg en el 2014 (FNC). No obstante, es considerada como una de las industrias más contaminantes del mundo, alterando el equilibrio ambiental y la calidad de vida del ser humano (Alfaro y Rodríguez, 1994; Matuk, 1997; Álvarez et al., 2011).

La transformación del café cereza (grano maduro) en café pergamino (granos despulpado y seco) se denomina beneficio del café. Existen dos métodos para realizar este proceso: 1) Beneficio por vía seca: consiste de secado del grano al sol o con máquinas, descascarillado mecánico para remover la pulpa residual, el mucílago y el pergamino, y la clasificación por tamaño de grano con el uso de cribas mecanizadas. 2) Beneficio por vía húmeda: comprende las etapas de despulpado, desmucilaginado, lavado y secado hasta obtener café pergamino seco, que luego se trilla para generar café almendra (café verde) para exportación (Puerta, 1999). Este último, es el más utilizado en Centroamérica y Colombia (Álvarez et al, 2011), donde la remoción del mucílago es un proceso estratégico para facilitar el secado del grano y obtener un café con propiedades organolépticas que mejoran su calidad (Alfaro y Rodríguez, 1994; Selvamurugan, 2010; Esquivel y Jiménez, 2012).

La remoción del mucílago durante el beneficio húmedo se puede hacer mediante tratamiento bioquímico, con el uso de “desmucilagadores mecánicos” o por fermentación natural (Puerta, 2009). Este proceso, implica el uso de grandes cantidades de agua, con un consumo medio de 40 l/kg de café pergamino seco, contaminando fuentes de agua con materia orgánica de los subproductos (Cenicafé, 2011). Estas aguas se componen de una mezcla de azúcares, proteínas, lípidos y compuestos fenólicos, que por su contenido deben ser tratadas

en sistemas de depuración (Avallone et al., 2000; Avallone et al., 2001; Álvarez et al., 2011). En vista de los problemas ambientales que ocasionan las 'aguas miel', se han implementado estrategias para reducir el consumo de agua y tratar los residuos orgánicos con sistemas anaerobios artesanales (Matuk, 1997; Cadena, 2005; Rodríguez y Zambrano, 2010; Cenicafé, 2011).

En la obtención de energía a partir del mucílago de café en forma de biogás (metano) o de bioetanol se han obtenido eficiencias energéticas variables (1.21 L/kg – balance positivo y 0.6 L/kg – balance negativo, respectivamente). Este producto corresponde a sólo 5% del rendimiento teórico, por lo que se persiste en la optimización de los procesos (Rodríguez y Zambrano, 2010).

En la degradación anaerobia de sustratos orgánicos complejos para la producción de biogás, intervienen miembros de los dominios *Bacteria* y *Archaea*, de acuerdo con sus roles fisiológicos. En condiciones anaerobias se produce lactato, piruvato, acetato y formiato, los cuales son utilizados por algunos grupos microbianos para la producción de CO₂, CH₄ y H₂. Si bien este microbioma está dominado por bacterias en un 90% (Wirth et al., 2012), en la actualidad poco se conoce sobre los mecanismos de producción de H₂ por el phylum *Actinobacteria*, los cuales son principalmente facultativos (Goodfellow et al., 2012; Wirth et al., 2012).

El phylum *Actinobacteria* es uno de los mayores grupos taxonómicos dentro del dominio *Bacteria*. La mayoría son bacterias filamentosas Gram positivas, con alto contenido de G+C en su ADN (aprox. 51% a 70%), variedad morfológica, metabólica y fisiológica (Gathogo et al., 2004; Ventura et al., 2007; Goodfellow et al., 2012).

Sin embargo, la literatura científica sobre la diversidad de actinobacterias que participan en la biodegradación de las 'aguas miel' es insuficiente. Las actinobacterias, al igual que los hongos, son eficientes en la degradación de lignocelulosa y compuestos fenólicos (Ramírez & Cocha, 2003). La caracterización de estas bacterias del suelo es importante para el diseño de sistemas de

biodegradación de las 'aguas miel' y por su alto potencial biotecnológico para la producción de antibióticos, enzimas, gases, agentes antitumorales e inmunosupresores (Wirth et al., 2012; Schäfer et al., 2013).

Con el fin de promover el uso alternativo de los residuos agroindustriales, en este caso las 'aguas miel' del café, que favorece el bienestar del ser humano, el ambiente y que sería el inicio para estudios futuros de producción de bioenergía, es necesario identificar qué tipo de actinobacterias presenta. Este trabajo de investigación modalidad pasantía está en el marco de un macroproyecto que tiene como objetivo explorar la producción de H₂ por parte de microorganismos del phylum *Actinobacteria*.

OBJETIVOS

General

Construir un cepario de bacterias del phylum *Actinobacteria*, provenientes de las 'aguas miel' de producción de café orgánico de la Hacienda "El Roble" (Mesa de los Santos, Santander).

Específicos

- Aislar, en medios de cultivo selectivo, actinobacterias de piscinas de tratamiento de mucílago de café orgánico de la Hacienda "El Roble".
- Caracterizar macro y microscópicamente las cepas aisladas de actinobacterias.
- Identificar molecularmente, en lo posible a nivel de género, los aislados mediante secuenciación del gen 16S rRNA.
- Realizar análisis de distancia genética con las secuencias obtenidas.
- Criopreservar las cepas aisladas de actinobacterias.

COMPETENCIAS

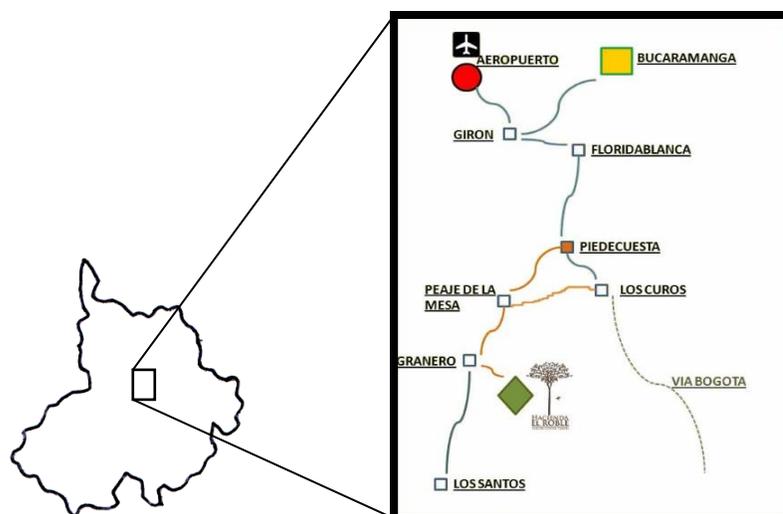
- Emplea adecuadamente los métodos para la obtención y almacenamiento de cepas axénicas de actinobacterias.
- Describe macro y microscópicamente las cepas aisladas de actinobacterias.
- Implementa las técnicas básicas de biología molecular para la identificación de cepas bacterianas basadas en el gen 16S rRNA.
- Realiza análisis de distancia genética con las secuencias obtenidas.
- Cumple con los horarios y las actividades acordadas.

1. MATERIALES Y METODOS

1.1 TOMA DE MUESTRAS

Muestras de 1L de 'agua miel' fue colectada de una piscina de fermentación natural de mucílago en un cultivo de café orgánico, en la Hacienda 'El Roble', Mesa de Los Santos, Santander (Fig. 1). Las muestras fueron almacenadas en botellas plásticas estériles debidamente etiquetadas, transportadas a 4°C y procesadas en el Laboratorio de Biología Molecular (Sede UIS Guatiguará).

Figura 1. Mapa de Santander; en el recuadro se muestra la localización del sitio de muestreo (rombo verde).



1.2 AISLAMIENTO PRIMARIO

Diluciones seriadas hasta 10^{-8} de la muestra de 'aguas miel' fueron sembradas mediante diseminación en agar Czapek-Dox suplementado con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nistatina para inhibir el crecimiento de hongos (Ramírez y Cocha, 2003). Los cultivos fueron

incubados a temperatura ambiente (~25°C), al tiempo que se realizó seguimiento permanente con registro de observaciones de caracteres taxonómicos relevantes y registro fotográfico.

1.3 INDIVIDUALIZACIÓN DE CEPAS DE ACTINOBACTERIAS

Detectadas las colonias a individualizar, fueron transferidas a medio selectivo de agar Czapek-Dox – Extracto de Levadura – Casaminoácidos (CYC), pH 7.0, suplementando con 50 µg/mL nistatina (Ramírez y Cocha, 2003). Los cultivos fueron incubados a temperatura ambiente (~25°C) por un periodo de 15 d, durante los cuales se hicieron las resiembras necesarias para obtener cultivos axénicos.

1.4 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE CULTIVOS AXÉNICOS DE ACTINOBACTERIAS

1.4.1 Caracterización macroscópica. Se realizó seguimiento continuo de los aislados registrando observaciones macroscópicas, como: morfología de la colonia, tipo y color del micelio aéreo en caso de presentarse y producción de pigmentos difusibles al medio (Ramírez y Cocha, 2003; Otero, 2011).

1.4.2 Caracterización microscópica. Se evaluó coloración de Gram a diferentes edades del cultivo, septación de filamentos y presencia de micelio. Se verificó la presencia y disposición del micelio utilizando la técnica de cultivo en laminilla (Franco, 2008), que consistió en introducir cuatro cubreobjetos estériles con una inclinación de 45° en cepas cultivadas en medio CYC. Después de incubar a temperatura ambiente (~25°C) por dos semanas, los cubreobjetos fueron retirados, fijados por calor, teñidos con Violeta de Genciana y se observaron bajo el microscopio (Wang et al., 1999; Franco, 2008; Otero, 2011). Además, se evaluó

la presencia y disposición de esporas mediante la tinción de Wirtz-Conklin con 0,1% verde de malaquita y 0,5% safranina (Schaeffer y MacDonald, 1933)

La identificación taxonómica con base en estas características se realizó según lo descrito en el manual de sistemática bacteriológica de Bergey's (2012).

1.5 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ACTINOBACTERIAS

1.5.1 Extracción de ADN total. A partir de cultivos líquidos de cada cepa aislada se realizó extracción de ADN total bacteriano según el protocolo propuesto por Ausubel *et al.* (1992), con las siguientes modificaciones: posterior al lavado con fenol/cloroformo/alcohol isoamil, se añadió un paso de lavado con un volumen igual de cloroformo para garantizar la obtención de ADN puro y la mayoría del ADN obtenido fue resuspendido en 50 µL de buffer TE RNasa (20 mg/ml RNasa).

1.5.2 Electroforesis en gel de agarosa. Para corroborar la calidad de los extractos de ADN se analizaron las diferentes muestras mediante electroforesis en gel 0.8% agarosa. Las muestras fueron coloreadas con EZ-Vision III® (AMRESCO, SOLON, OH, USA) y conservadas a -20° C hasta su uso.

1.6 AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN 16S rRNA Y SECUENCIACIÓN

La amplificación del gen 16S rRNA se realizó mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos 27F y 1492R (Lane *et al.*, 1991), 1159R (Blackwood *et al.*, 2005); 338F (Guo *et al.*, 2008) y 907R (Muyzer *et al.*, 1993), 1159R (Tabla 1). La mezcla de reacción en todos los casos se realizó en un volumen total de 25 µL según lo descrito por Revollo *et al.* (2012).

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación parcial del gen 16S rRNA.

| Pares | Oligonucleótidos | Secuencia (5´- 3´) | Tamaño esperado | Temperatura de hibridización |
|-------|------------------|-------------------------|-----------------|------------------------------|
| 1 | 27F | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG | ≈1465 pb | 58 - 60°C |
| | 1492R | GGTTACCTTGTTACGACTTT | | |
| 2 | 27F | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG | ≈1132 pb | |
| | ACT1159R | TCCGAGTTRACCCCGGC | | |
| 3 | EUB338F | ACTCCTACGGGAGGCAGCAGCAG | ≈820 pb | |
| | ACT1159R | TCCGAGTTRACCCCGGC | | |
| 4 | EUB338F | ACTCCTACGGGAGGCAGCAGCAG | ≈569 pb | |
| | 907R | CCGTCCATTCTTTGAGTTT | | |

Los amplificados fueron visualizados mediante electroforesis en 0.8% agarosa y coloreadas con EZ-Vision III® (AMRESCO, Solon, OH, USA).

1.6.1 Purificación del ADN y obtención de secuencias. Los amplificados fueron purificados mediante el kit GeneJET™ PCR (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Las secuencias fueron obtenidas mediante secuenciador analítico ABI 3730 XL, en Macrogen (Corea).

1.7 ANÁLISIS DE SECUENCIAS DEL GEN 16S rRNA

La lectura de los cromatogramas se realizó en el programa Geneious V.8.0 (Kearse et al., 2012) y la presencia de quimeras se detectó usando la aplicación en línea Bellerophon (Huber et al., 2004). Paralelamente, se hizo una captura de secuencias de referencia mediante la búsqueda con la aplicación en línea BlastN, en las bases de datos NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Se tuvieron en cuenta sólo aquellas secuencias con una identidad superior al 95% y una cobertura mayor al 90%. Además, se tomaron en cuenta secuencias de referencia del manual de bacteriología determinativa de Bergey's (2012).

Se implementaron análisis de distancia genética para la atribución de taxones a los genes 16S rRNA secuenciados. Aquellas secuencias con identidad genética $\geq 95\%$ se asignaron a la categoría de género (Ludwing et al., 1998) y $\geq 97\%$ para especie (Stackebrandt y Goebel, 1994).

1.7.1 Matrices y árboles de distancia. Con las secuencias de referencia obtenidas del NCBI y secuencias homólogas obtenidas del manual de bacteriología determinativa de Bergey's (2012) se construyeron alineamientos con el algoritmo Muscle (Edgar, 2004). Las matrices y los árboles de distancia fueron construidos por el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) con el programa Geneious V.8.0 (Kearse et al., 2012).

1.8 CRIOPRESERVACIÓN DE CULTIVOS.

Cultivos axénicos en medio líquido fueron criopreservados en 20% glicerol de acuerdo al protocolo propuesto por Sambrook & Russell (2001). Las cepas fueron almacenadas a -70° C por triplicado en el cepario del Laboratorio de Biología Molecular.

2. RESULTADOS

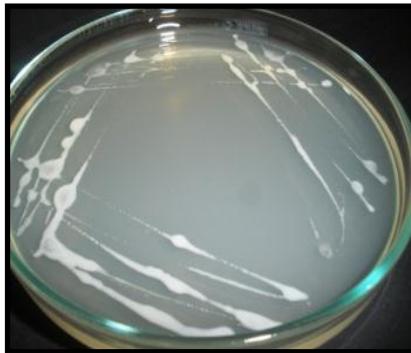
2.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE CULTIVOS AXÉNICOS DE ACTINOBACTERIAS

A partir del residuo post-cosecha 'aguas miel' del beneficio de café orgánico, se obtuvo un total de 21 aislados con variabilidad morfológica. La caracterización morfológica de las cepas aisladas confirmó que el 100% de éstas pertenecen al grupo *Actinobacteria*, todas bacterias Gram-positivas y de morfología variable. A continuación, se describen detalladamente las características macroscópicas y microscópicas de las actinobacterias aisladas.

1. Cepa MFSR - 1

Descripción macroscópica:

Colonias de color crema, forma circular, convexa, superficie lisa, margen irregular, y de consistencia cremosa. En cultivo ≥ 15 d el color de la colonia se desvanece hacia el borde, presenta pigmento difusible de color pardo y su tamaño es de 3 – 4 mm:



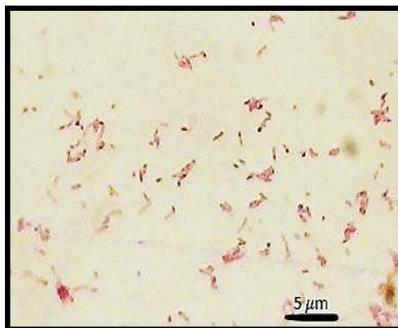
3 d de cultivo



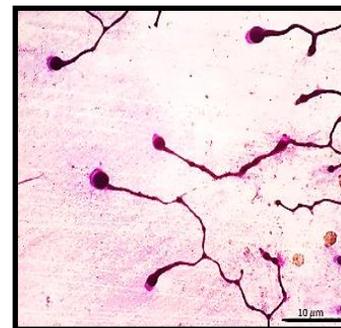
15 d de cultivo

Descripción microscópica:

Células cocoides con tamaño $< 1 \mu\text{m}$, individuales o formando agrupaciones de dos o más células. Presencia de micelio vegetativo con hifas ramificadas, sin septos, de longitud variable, y micelio aéreo ramificado, hifas con esporangióforos y presencia de esporas:



Tinción de Gram - 100X



Micelio aéreo - 10X

2. Cepa MFSR - 2

Descripción macroscópica:

Colonias jóvenes de color crema, forma irregular, superficie lisa y consistencia cremosa. Pasado el quinto día de siembra, el color es naranja y se observa el crecimiento de colonias de aspecto granular sobre aquellas cremosas. En cultivos ≥ 15 d las colonias abarcan por completo el medio de cultivo:



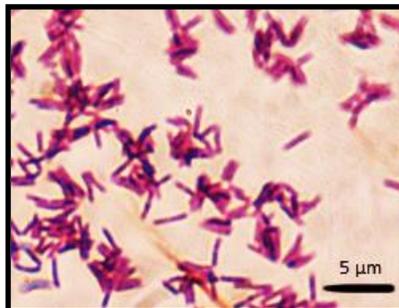
3 d de cultivo



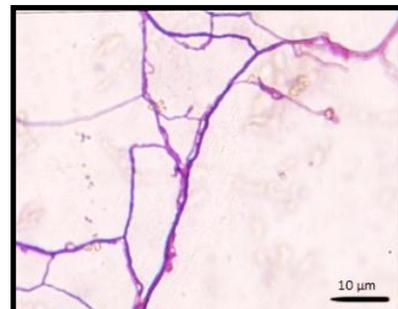
15 d de cultivo

Descripción microscópica:

Células cocobacilares con un tamaño $< 1 \mu\text{m}$, generalmente agrupados formando cadenas de 3 – 4 células. Micelio vegetativo ramificado, hifas de longitud variable, y micelio aéreo ramificado formando una red, hifas alargadas, septadas, algunas con esporangióforos en ápice y presenta esporas:



Tinción de Gram - 100X



Micelio aéreo - 10X

3. Cepa MFSR - 3

Descripción macroscópica:

Colonias de color crema, forma circular, elevación umbonada, superficie lisa, consistencia cremosa, margen entero y borden liso. En cultivo de 15 d presenta pigmento difusible color pardo y el tamaño de la colonia es ≈ 6 mm:



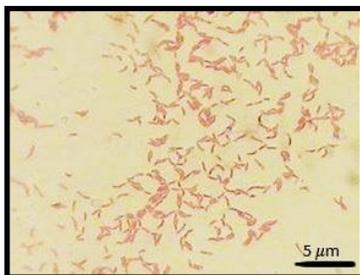
3 d de cultivo



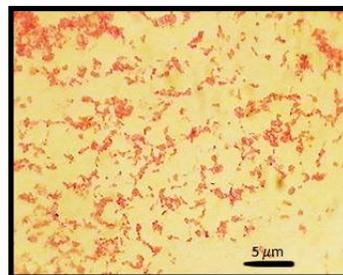
15 d de cultivo

Descripción microscópica:

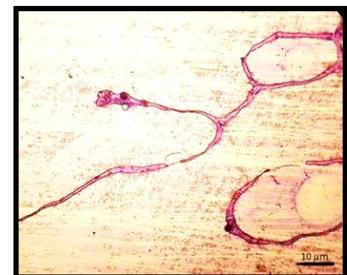
Exhibe ciclo de crecimiento bacilo-cocoide; a las 24 h de cultivo presenta células alargadas generalmente agrupadas; a los 3 días se compone de células cocoides con un tamaño cercano a $1 \mu\text{m}$. Presenta sólo micelio vegetativo con hifas alargadas y sin septos.



Tinción de Gram - 100X
24 h de cultivo



Tinción de Gram - 100X
3 d de cultivo



Micelio vegetativo - 10X

4. Cepa MFSR - 4

Descripción macroscópica:

En cultivos <72 h se observan colonias con apariencia granulosa de color amarillo, forma alargada y circular. Posteriormente (≥ 10 d), colonias de color amarillo de consistencia cremosa, superficie lisa, convexa, circular, margen entero. El tamaño de la colonia oscila entre los 3 – 4mm. Los cultivos no presentan pigmento difusible al medio:



3 d de cultivo

10 d de cultivo

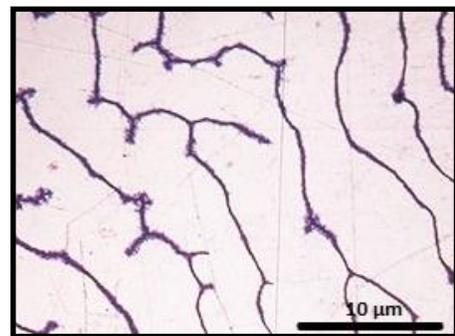
15 d de cultivo

Descripción microscópica:

Células en forma de cocos, con un tamaño $< 1 \mu\text{m}$ y en su mayoría dispuestos en tétradas. Presenta micelio vegetativo compuesto por hifas alargadas y poco ramificadas, septadas y de $\approx 2 \mu\text{m}$ de ancho:



Tinción de Gram - 100X

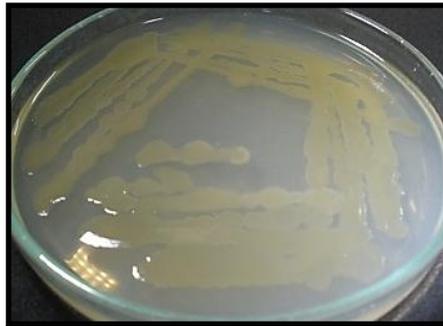


Micelio vegetativo- 10 X

5. Cepa MFSR - 5

Descripción macroscópica:

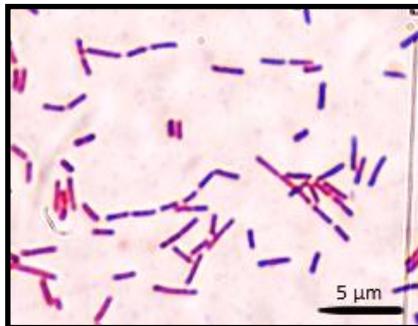
Colonias de forma irregular, elevación aplanada, superficie y margen irregular, consistencia viscosa y color amarillo oscuro. Con 10 d de siembra, las colonias se secan desde el centro hacia la periferia. Se observa difusión de pigmento de color pardo al medio.



20 d de cultivo

Descripción microscópica:

Células en forma de cocos con un tamaño $<1 \mu\text{m}$ y organizados en cadenas de 3 – 6 cocos. Presenta micelio vegetativo compuesto por hifas alargadas, ramificadas, sin septos, $\approx 1 \mu\text{m}$ de ancho y con células en su interior:



Tinción de Gram - 100X



Micelio vegetativo - 10X

6. Cepa MFSR - 6

Descripción macroscópica:

Colonias de forma redonda, elevación umbonada, superficie lisa, consistencia viscosa, margen ondulado, de color naranja opaco en el centro y translúcida en los bordes. Tamaño de las colonias de 3 – 6 mm:



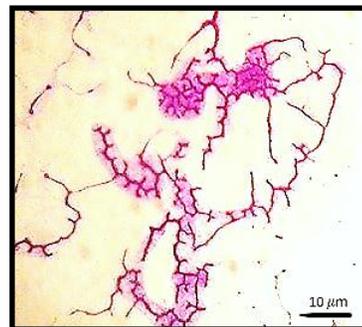
20 d de cultivo

Descripción microscópica:

Células en forma de bacilos irregulares, largos y/o cortos, con un tamaño $\approx 1 \mu\text{m}$ de largo por $0.5 - 0.7 \mu\text{m}$ de ancho. Micelio vegetativo poco ramificado y micelio aéreo con hifas ramificadas, de longitud variable, sin septos y esporangióforos en ápices:



Tinción de Gram - 100X



Micelio aéreo - 10X

7. Cepa MFSR - 7

Descripción macroscópica:

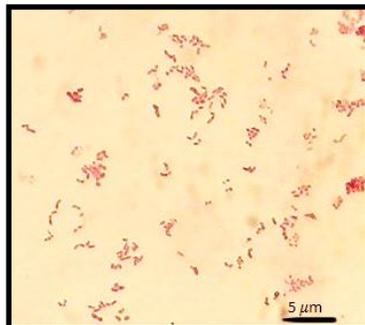
Colonias de forma redonda, convexa, superficie rugosa, margen irregular, de color crema claro brillante y consistencia cremosa. Tamaño de la colonia de 1 – 2 mm. En cultivos >15 días se observa pigmento de color pardo difusible al medio:



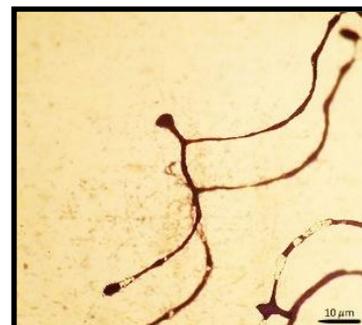
15 d de cultivo

Descripción microscópica:

Células cocoides de forma irregular, en su mayoría de tamaño $<1 \mu\text{m}$ de diámetro, individuales o fusionadas. Micelio aéreo con hifas ramificadas, alargadas, sin septos, esporangióforos en zonas intermedias y presencia de esporas:



Tinción de Gram - 100X

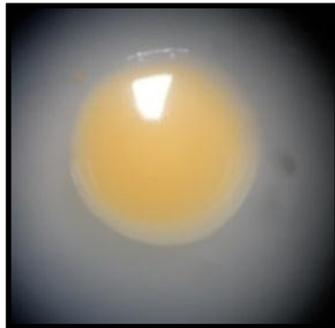


Micelio aéreo - 40X

8. Cepa MFSR - 8

Descripción macroscópica:

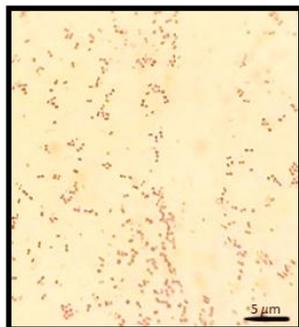
Colonias de color naranja, brillante, redondas, convexas, con superficie lisa, margen entero y consistencia gelatinosa. En cultivo ≥ 5 días el color naranja se observa en el centro de la colonia y en el borde es translucido. Tamaño de las colonias de 1.5 – 3 mm. No se presentan pigmentos difusibles al medio:



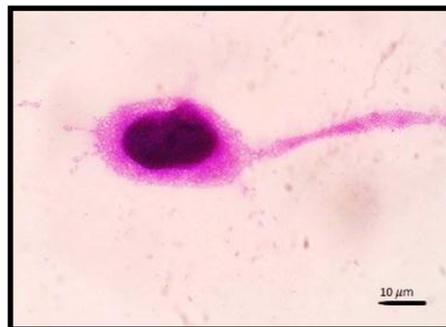
10 d de cultivo

Descripción microscópica:

Cocos con un tamaño $>1\mu\text{m}$, dispuestos de forma individual, diplococos y algunas tétradas. Micelio vegetativo con hifas alargadas sin septos, ramificadas y con células coccas en su interior:



Tinción de Gram - 100X



Micelio vegetativo- 100X

9. Cepa MFSR - 9

Descripción macroscópica:

Colonias ≤ 3 días de color blanco con matices tornasoles, forma irregular, superficie lisa con pliegues, margen irregular y consistencia cremosa. Cultivos ≥ 10 días colonias de color naranja y superficie cerebriforme. No difunde pigmento al medio:



3 d de cultivo

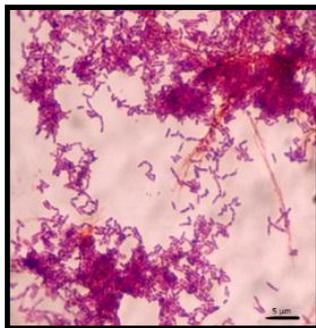


10 d de cultivo

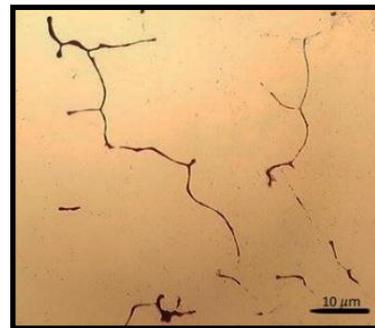


Descripción microscópica:

Células en forma de cocos y cocoides con un tamaño $< 1\mu\text{m}$ dispuestos en su mayoría en cadenas de 3 – 6 células. Micelio vegetativo con hifas alargadas, sin septos, poco ramificadas y con células cocoides en el interior:



Tinción de Gram - 100X

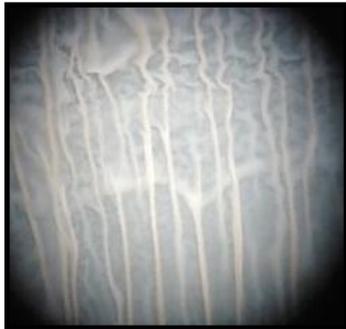


Micelio vegetativo - 10X

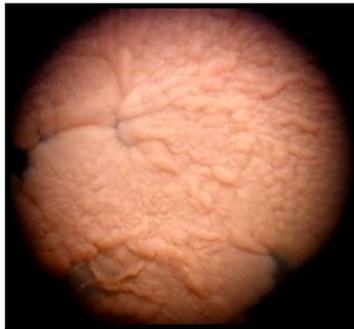
10. Cepa MFSR - 10

Descripción macroscópica:

Colonias ≤ 3 días de color blanco con matices tornasoles, forma irregular, superficie lisa con pliegues, margen irregular y consistencia cremosa. En cultivo ≥ 10 días el color de las colonias es rosado, con superficie cerebriforme y consistencia seca:



3 d de cultivo



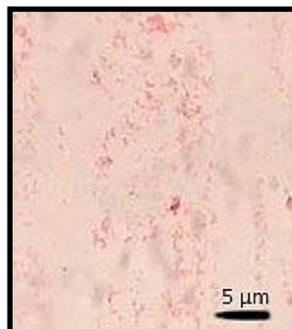
10 d de cultivo



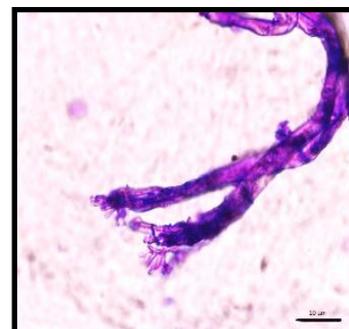
20 días de cultivo

Descripción microscópica:

Células cocobacilares con un tamaño $< 1\mu\text{m}$, dispuestas en cadenas y/o en empalizada. Micelio vegetativo poco ramificado y micelio aéreo con hifas de longitud variable, ramificadas, sin septos y con conidióforos:



Tinción de Gram - 100X



Micelio aéreo - 100X

11. Cepa MFSR - 11

Descripción macroscópica:

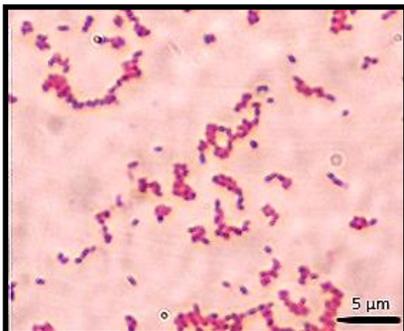
Colonias de color amarillo, forma circular, elevación convexa leve, margen entero, superficie lisa y consistencia viscosa. No difunde pigmento al medio y el tamaño de las colonias es ≈ 3 mm:



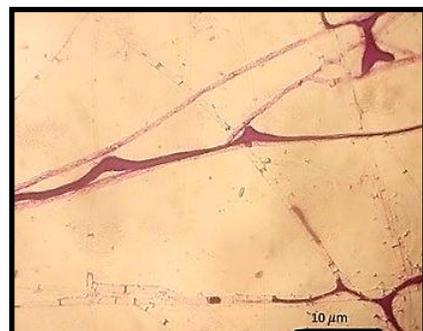
10 d de cultivo

Descripción microscópica:

Células cocoides de tamaño ≈ 1 μm de largo por <1 μm de ancho, individuales y/o en cadenas de 3 – 7 células. Micelio vegetativo con hifas largas, septadas y ramificadas formando una red:



Tinción de Gram - 100X



Micelio vegetativo - 40X

12. Cepa MFSR - 12

Descripción macroscópica:

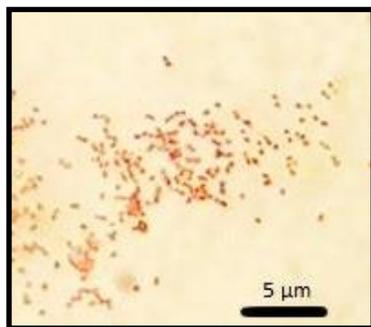
Colonias de color amarillo brillante, forma circular, elevación convexa leve, superficie lisa, margen entero y consistencia viscosa. No difunde pigmento al medio y el tamaño de la colonia oscila entre 3 y 4 mm:



10 días de cultivo

Descripción microscópica:

Células con forma de cocos de tamaño $<1\mu\text{m}$, organizados en su mayoría en cadena. Micelio vegetativo con hifas poco ramificadas y micelio aéreo con hifas alargadas, sin septos, ramificadas y esporangióforos en su ápice:



Tinción de Gram - 100X



Micelio aéreo - 40X

13. Cepa MFSR - 13

Descripción macroscópica:

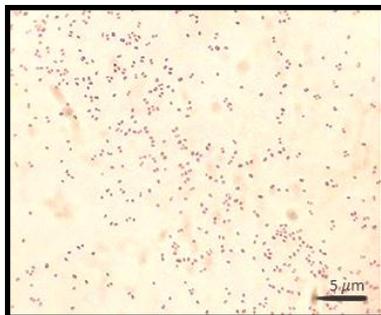
Colonias de color amarillo, forma redonda, elevación convexa leve, superficie lisa, margen entero y consistencia cremosa. El tamaño de las colonias oscila entre 3 - 4 mm y se observa pigmento de color pardo difusible al medio:



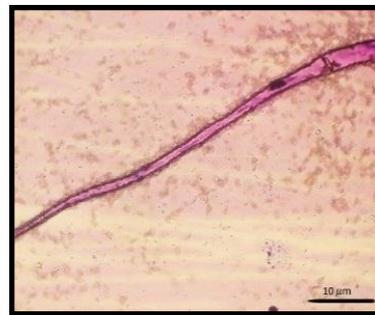
15 d de cultivo

Descripción microscópica:

Células con forma de cocos de tamaño $>1\mu\text{m}$, individuales o fusionados. Micelio vegetativo con hifas poco ramificadas, largas e irregulares, sin septos y con células coccas en su interior:



Tinción de Gram - 100X



Micelio vegetativo – 40X

14. Cepa MFSR - 14

Descripción macroscópica:

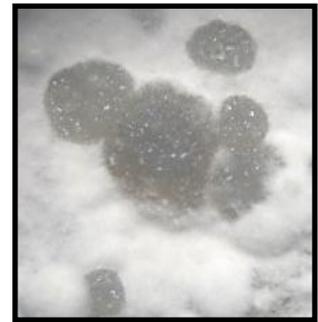
Colonias de 48 h redondas, superficie lisa, elevación convexa, margen irregular, color blanco tornasolado, consistencia dura y tamaño ≈ 1 mm. A las 72 h se observó micelio aéreo en forma de polvo blanco en el borde de la colonia y secreciones viscosas. Cultivo ≥ 8 d con colonias de aspecto polvoso de color blanco, forma irregular y exhibe pigmento difusible al medio de color café. Presenta fuerte olor a tierra húmeda:



2 d de cultivo

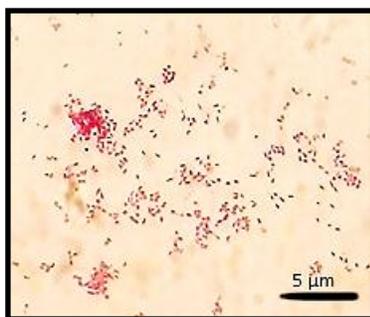


15 d de cultivo

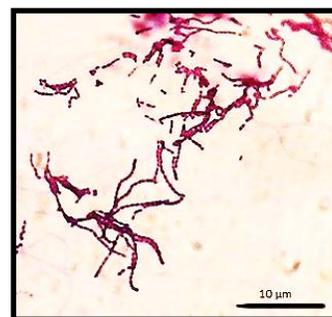


Descripción microscópica:

Células con forma de cocos individuales y/o dispuestos en cadenas, con un tamaño $>1 \mu\text{m}$. Micelio vegetativo ramificado con hifas no septadas, y micelio aéreo ampliamente ramificado, con hifas alargadas, algunas terminadas en espiral y largas cadenas de conidios:



Tinción de Gram - 100X

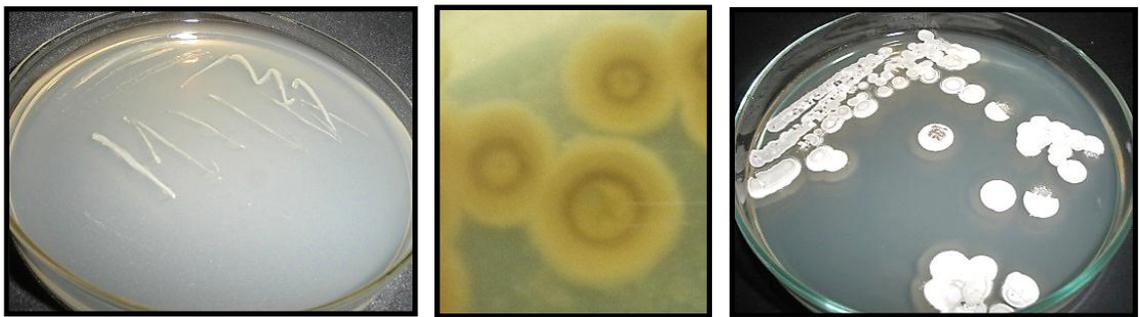


Micelio aéreo - 100X

15. Cepa MFSR - 15

Descripción macroscópica:

Colonias ≤ 48 h de forma irregular, elevación convexa, superficie lisa, consistencia dura y color crema translúcida. En cultivo ≥ 15 d colonias circulares, polvosas de color blanco de ≈ 4 mm, presenta pigmento difusible al medio de color pardo. Envés de las colonias color café oscuro y presenta fuerte olor a tierra húmeda.

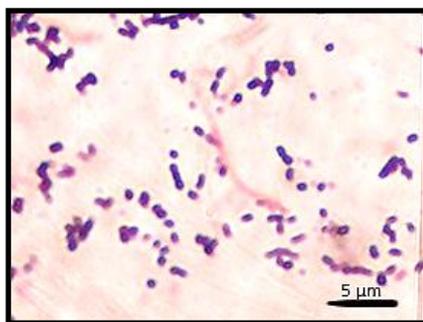


2 d de cultivo

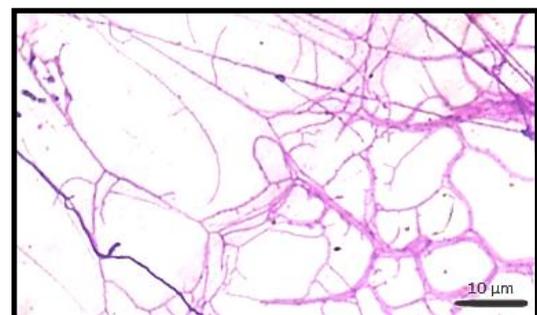
15 d de cultivo

Descripción microscópica:

En su mayoría células cocoides de $1\mu\text{m}$, individuales y/o dispuestas en cadenas de 3 – 6 células. Micelio vegetativo ramificado, y micelio aéreo con hifas alargadas, ampliamente ramificadas formando una red, no septadas y cadenas de conidios:



Tinción de Gram - 100X



Micelio aéreo - 10X

16. Cepa MFSR - 16

Descripción macroscópica:

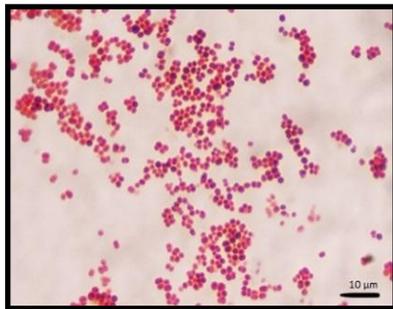
Colonias color blanco, forma puntiforme de ≈ 1 mm, elevación convexa, margen entero, superficie lisa y consistencia cremosa. Envés de las colonias color pardo y no difunden pigmento al medio:



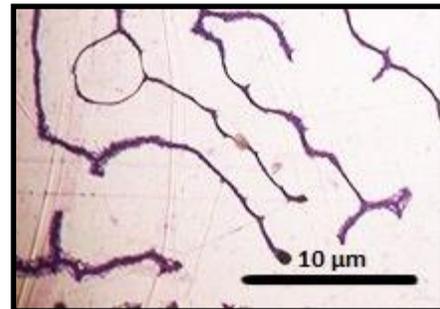
10 d de cultivo

Descripción microscópica:

Células en forma de cocos entre $1 - 1.5 \mu\text{m}$ de diámetro, dispuestos en su mayoría en grupos de 2 o más células. Presenta micelio aéreo ramificado con hifas alargadas y esporangióforos en el ápice:



Tinción de Gram - 100X

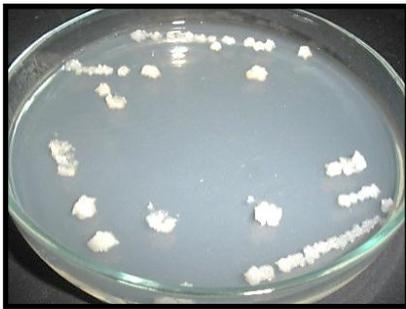


Micelio aéreo- 100X

17. Cepa MFSR - 17

Descripción macroscópica:

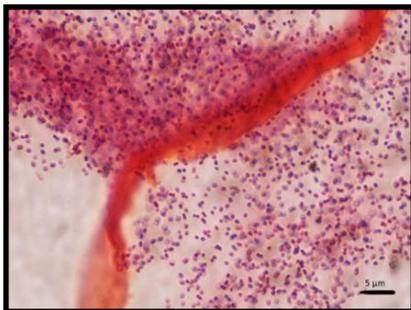
Colonias de forma irregular similar a molares entre 3 – 6 mm que penetran el medio de cultivo, de color blanco, consistencia blanda, margen irregular, y no difunden pigmento al medio:



30 d de cultivo

Descripción microscópica:

Células coco-bacilares de $\approx 1 \mu\text{m}$, individuales e inmersos en una matriz. Micelio vegetativo ramificado, y micelio aéreo con hifas alargadas, ampliamente ramificadas, sin septos y con esporangióforos en el ápice:



Tinción de Gram - 100X



Micelio aéreo – 100X

18. Cepa MFSR - 18

Descripción macroscópica:

Cultivo ≤ 10 días con colonias de forma irregular, superficie irregular, de color blanco con secreciones líquidas de color crema y aspecto polvoso. En cultivo ≥ 30 días, el color del polvo en los bordes de la colonia se oscurece en tonos café-verdosos, permaneciendo el blanco en el centro de la misma e inverso de color pardo:



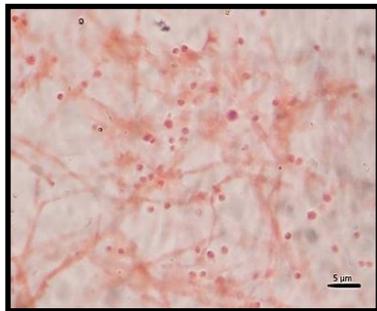
10 d de cultivo



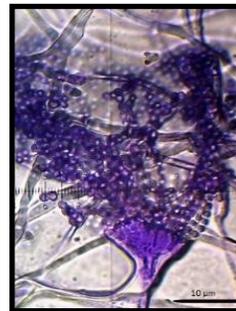
30 d de cultivo

Descripción microscópica:

Células con forma de cocos individuales con un tamaño $>1 \mu\text{m}$. Micelio vegetativo ampliamente ramificado, y micelio aéreo con hifas ramificadas formando una red, sin septos y con conidióforos en algunos de sus ápices con cadenas largas de conidios:



Tinción de Gram - 100X



Micelio aéreo - 100X

19. Cepa MFSR - 19

Descripción macroscópica:

Colonia de consistencia gelatinosa de color rosado translucido, forma irregular extendida en la superficie del medio de cultivo. Las colonias no difunden pigmento al medio:



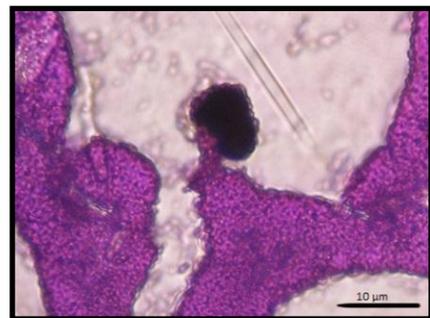
10 d de cultivo

Descripción microscópica:

Células con forma de cocos de tamaño $<1 \mu\text{m}$ de diámetro, individuales y/o en su mayoría cadenas de 2 – 6 células. Micelio vegetativo poco ramificado, y micelio aéreo con ramificación dicotómica, hifas sin septos y presencia de esporas:



Tinción de Gram - 100X



Micelio aéreo – 100X

20. Cepa MFSR - 20

Descripción macroscópica:

Colonias de color blanco, forma filamentososa, consistencia viscosa, de tamaño variable y sin presencia de pigmento difusible al medio:



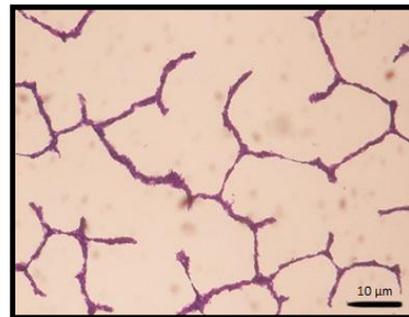
10 d de cultivo

Descripción microscópica:

Células cocobacilares de tamaño variable, en su mayoría de 5 μm de largo por 4 μm de ancho. Micelio vegetativo ramificado, y micelio aéreo poco ramificado con hifas septadas, de longitud variable, con estructuras rectangulares en su interior y esporangióforos en algunos de sus ápices:



Tinción de Gram - 100X



Micelio aéreo - 10X

21. Cepa MFSR - 21

Descripción macroscópica:

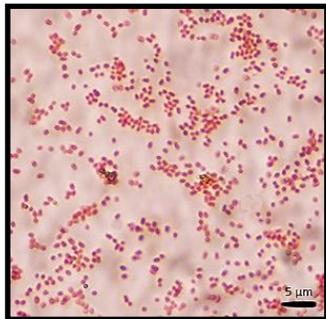
Colonias continuas de forma irregular similar a molares entre 2 – 4 mm, color blanco translucido, margen irregular, consistencia dura, y no difunde pigmento al medio:



30 d de cultivo

Descripción microscópica:

Células con forma de cocos $<1 \mu\text{m}$, individuales y/o dispuestos en aglomerados y cadenas. Micelio vegetativo ramificado, y micelio aéreo poco ramificado, con hifas de longitud variable, sin septos y esporangióforos en el ápice:



Tinción de Gram - 100X

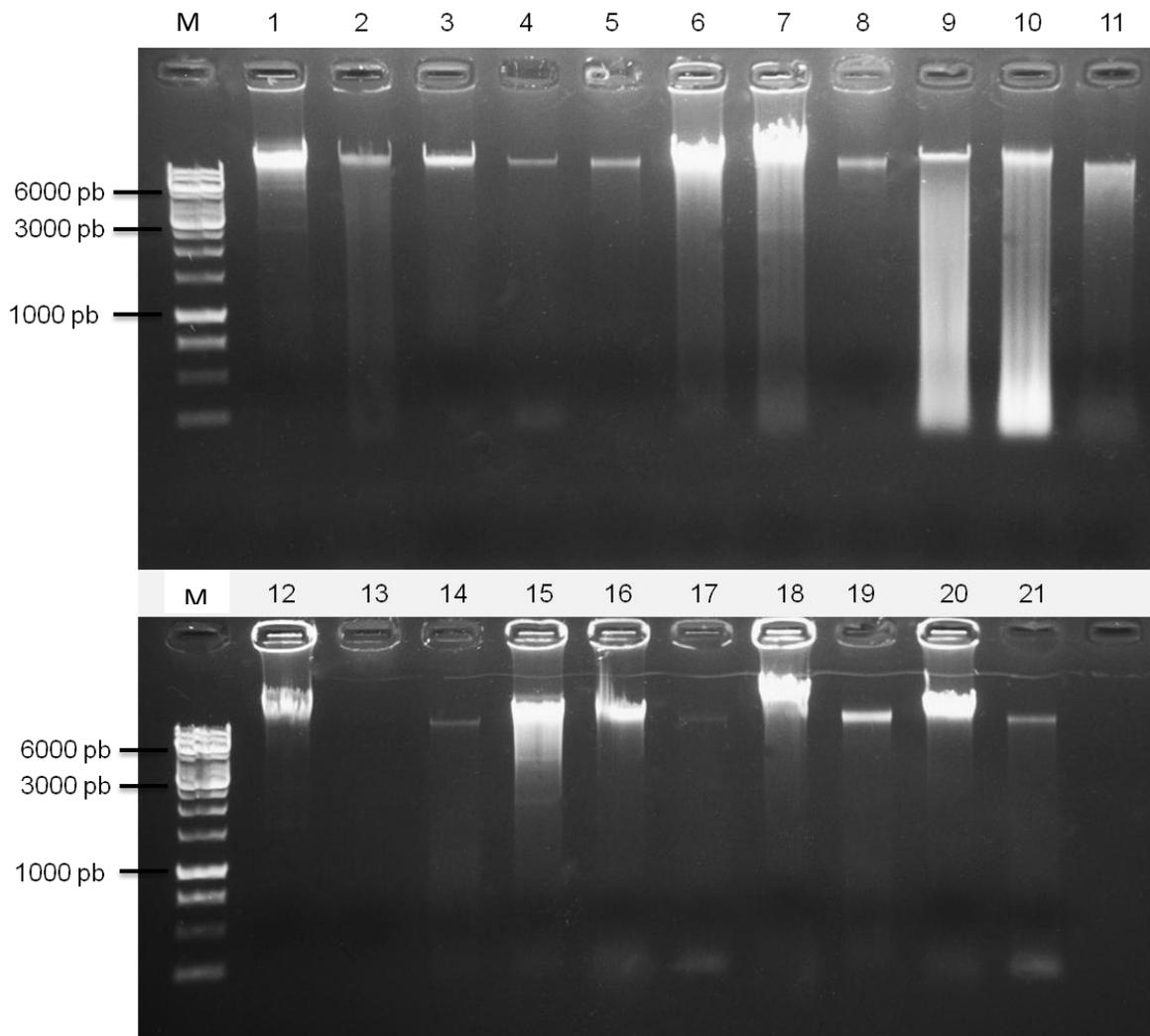


Micelio aéreo – 40X

2.2 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ACTINOBACTERIAS

Para complementar la identificación taxonómica, se recurrió al apoyo de evidencia molecular. Inicialmente, se obtuvieron extractos de ADN total bacteriano de cada una de las cepas aisladas (Figura 2).

Figura 2. Gel 0.8% agarosa de extractos de ADN total de las cepas de aisladas. Marcador de peso molecular 1 Kb Thermo Scientific® [M]. Extractos de las Cepa MFSR-1 a MFSR-21 [1-21].

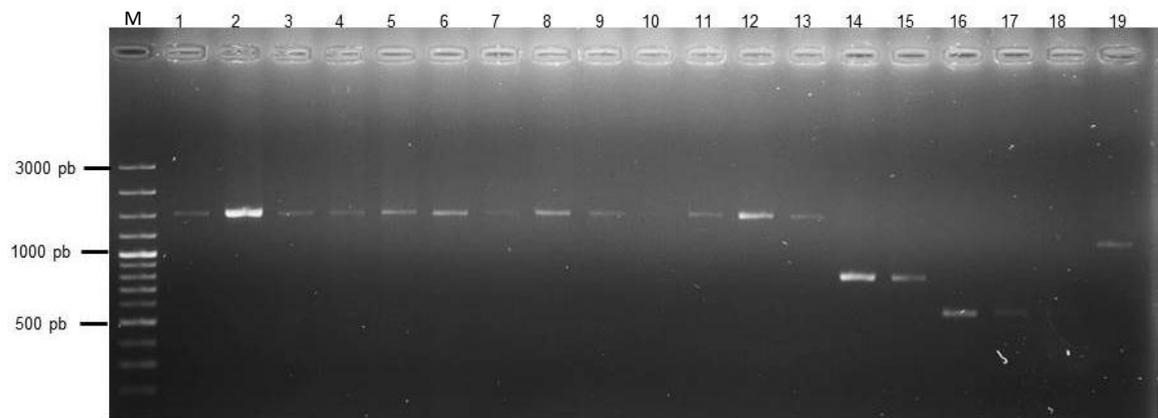


Los extractos de ADN total bacteriano, con un número de pares de bases estimado en >20 kb, fueron en su mayoría de buena calidad. No obstante, en los carriles 9 y 10 (Cepas MFSR - 9 y MFSR - 10) se evidencia degradación del ADN

o la presencia de ARN, porque no se adicionó RNAasa en el proceso de extracción. En general, los extractos presentaron un rendimiento de 0.25 µg – 12 µg.

Posteriormente, se hizo PCR con los ADN extraídos, buscando cubrir las regiones hipervariables informativas del gen 16S rRNA en *Actinobacteria*, e.g., V3 y V5 (Li *et al.*, 2009), i.e., posiciones 433 – 497 y 822 – 879, respectivamente (Chakravorty *et al.*, 2007). Estas regiones se amplificaron con los oligonucleótidos 27F y 1492R; en los casos en los que no se logró un producto, se recurrió a los pares 338F – 907R, 338F – 1159R y 27F – 1159R, como se detalla en la Figura 3.

Figura 3. Gel 0,8% agarosa de amplificados parciales del gen 16S rRNA. M: Marcador de peso molecular '100 pb Thermo Scientific®'. Carriles 1 – 13 [cepas MFSR-1, 2, 4, 5, 6, 7, 13, 14, 15, 16, 19, 20 y 21], oligonucleótidos 27F y 1492R (≈1465 pb). Carriles 14 – 15 [cepas MFSR-3 y 9], cebadores 338F y 1159R (≈820 pb). Carriles 16 – 18 [cepas MFSR-8, 10 y 12], cebadores 338F y 907R ≈569 pb. Carril 19 [cepa MFSR-11], cebadores 27F y 1159R (≈1132 pb).



La secuenciación directa de los amplificados se contrató con la empresa MacroGen (Corea), en su mayoría con los dos oligonucleótidos con los que se realizó la amplificación por PCR. Las secuencias recibidas fueron verificadas para evitar la presencia de anomalías tipo quimera y se procedió a asignar los taxones a cada una de las cepas aisladas. Se identificaron cinco géneros, siendo *Streptomyces* sp el más representativo (Tabla 2). La mayoría de las secuencias

presentaron una identidad $\geq 97\%$ con las secuencias encontradas en las bases de datos mediante BlastN (Tabla 2). No obstante, los porcentajes de identidad obtenidos para las cepas MFSR-12 (94%) y MFSR-13 (92%) limitaron la identificación molecular de estas cepas a nivel taxonómico de género. En el caso de las cepas MFSR-17 y MFSR-18 no se logró asignación taxonómica molecular, en vista de que las secuencias recibidas fueron de mala calidad; de ahí su ausencia en la Figura 3.

Tabla 2. Asignación taxonómica de las cepas del phylum *Actinobacteria* aisladas de ‘aguas miel’ con base en alineamientos BlastN del gen 16S rRNA.

| Aislado | Género más cercano (Nº de acceso) | Identidad (%) |
|---------|--------------------------------------|------------------|
| MFSR-1 | <i>Streptomyces</i> (EU384279) | 98% |
| MFSR-2 | <i>Streptomyces</i> (FJ951435) | 99% |
| MFSR-3 | <i>Arthrobacter</i> (KJ626449) | 99% |
| MFSR-4 | <i>Micrococcus</i> (KF424616) | 99% |
| MFSR-5 | <i>Micrococcus</i> (KJ843153) | 99% |
| MFSR-6 | <i>Streptomyces</i> (FJ867927) | 99% |
| MFSR-7 | <i>Streptomyces</i> (KF996505) | 99% |
| MFSR-8 | <i>Gordonia</i> (NC013441) | 98% |
| MFSR-9 | <i>Gordonia</i> (JQ658421) | 99% |
| MFSR-10 | <i>Streptomyces</i> (KF996505) | 100% |
| MFSR-11 | <i>Leifsonia</i> (JX067673) | 99% |
| MFSR-12 | <i>Streptomyces</i> (JF751041) | 94% |
| MFSR-13 | <i>Micrococcus</i> (KC469953) | 92% |
| MFSR-14 | <i>Streptomyces</i> (KJ571077) | 98% |
| MFSR-15 | <i>Streptomyces</i> (AB184106) | 97% |
| MFSR-16 | <i>Streptomyces</i> (AY641538) | 99% |
| MFSR-17 | No determinada | |
| MFSR-18 | No determinada | |
| MFSR-19 | <i>Streptomyces</i> (AY641538) | 99% |
| MFSR-20 | <i>Streptomyces</i> (AY641538) | 99% |
| MFSR-21 | <i>Streptomyces</i> (FJ867927) | 99% |

Posteriormente, con base en los géneros determinados por BlastN, se realizó la captura de secuencias de referencia sugeridas en el manual de bacteriología determinativa de Bergey's (2012) (Tabla 3). Un árbol de distancia fue construido con las secuencias obtenidas, las sugeridas en el manual de bacteriología determinativa de Bergey's (2012) y las alojadas en la base de datos de Genbank (Figura 4). De acuerdo con los valores de identidad, las secuencias se agruparon con los grupos taxonómicos *Streptomyces*, *Micrococcus*, *Gordonia*, *Arthrobacter* y *Leifsonia* (Fig. 4).

Tabla 3. Secuencias de referencia tomadas de Bergey's (2012). Se diferencian los 5 géneros identificados por colores.

| Secuencias de referencia | |
|--------------------------------------|------------|
| Especie sugerida | No. Acceso |
| <i>Leifsonia aquatica</i> | D45057 |
| <i>Leifsonia shinshuensis</i> | DQ232614 |
| <i>Arthrobacter uratoxydans</i> | X83410 |
| <i>Arthrobacter nicotianae</i> | X80739 |
| <i>Arthrobacter arilaiti</i> | AJ609628 |
| <i>Micrococcus flavus</i> | DQ491453 |
| <i>Micrococcus luteus</i> | AJ536198 |
| <i>Micrococcis yunnanensis</i> | FJ214355 |
| <i>Gordonia rhizosphaera</i> | AB004729 |
| <i>Gordonia terrae</i> | X79286 |
| <i>Gordonia aichiensis</i> | X80633 |
| <i>Streptomyces bluensis</i> | X79324 |
| <i>Streptomyces synnematoformans</i> | EF121313 |
| <i>Streptomyces caeruleus</i> | EF178675 |
| <i>Streptomyces aurantiacus</i> | AJ781383 |
| <i>Streptomyces colombiensis</i> | DQ026646 |
| <i>Streptomyces galbus</i> | X79852 |

Finalmente, se procedió a la determinación definitiva de las 21 cepas aisladas, complementando la caracterización morfológica con la molecular (Tabla 4). Se concluyó la presencia de 3 órdenes y 5 géneros de actinobacterias en las 'aguas miel': *Corynebacteriales* (*Gordonia* sp), *Micrococcales* (*Micrococcus* sp, *Arthrobacter* sp y *Leifsonia* sp) y *Streptomycetales* (*Streptomyces* sp). Este último género fue el más representativo, con 14 cepas (67%) (Figura 5).

Figura 4. Árbol de distancia inferido a partir de secuencias del gen 16S rRNA de cepas de *Actinobacteria*, mediante el método de Neighbor-Joining. El árbol consenso *bootstrap* inferido de 1000 réplicas es tomado para representar las relaciones entre los taxa analizados. El árbol es dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades de las distancias evolutivas usadas para inferir el árbol. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el método de Kimura 2-parámetros y están en unidades de número de sustituciones por sitio. El análisis involucró 19 secuencias nucleotídicas. Todas las posiciones incluyendo gaps y datos perdidos fueron eliminadas y el conjunto de datos final está representado en 817 posiciones. Los análisis de distancia fueron construidos en Geneious®.

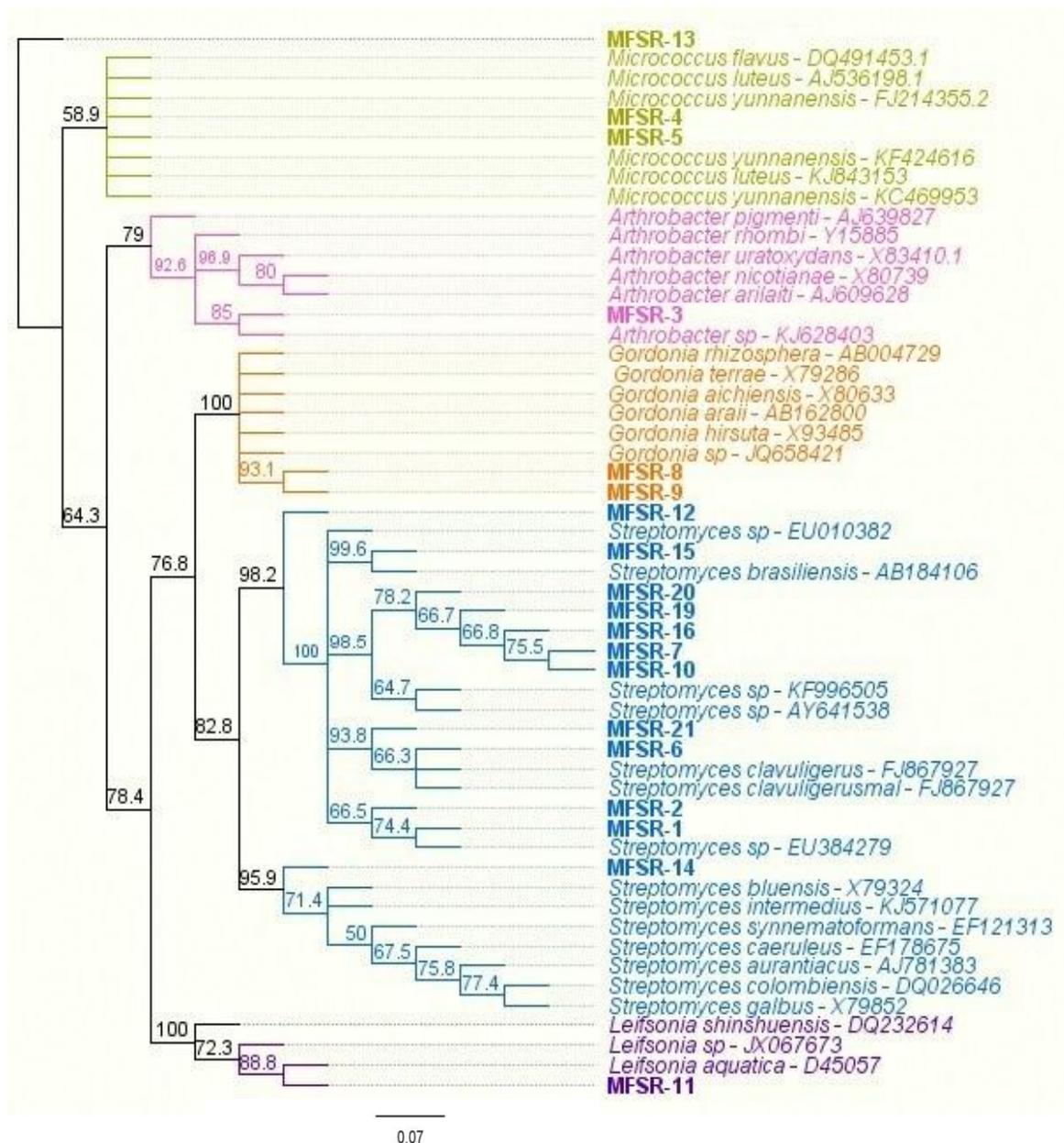
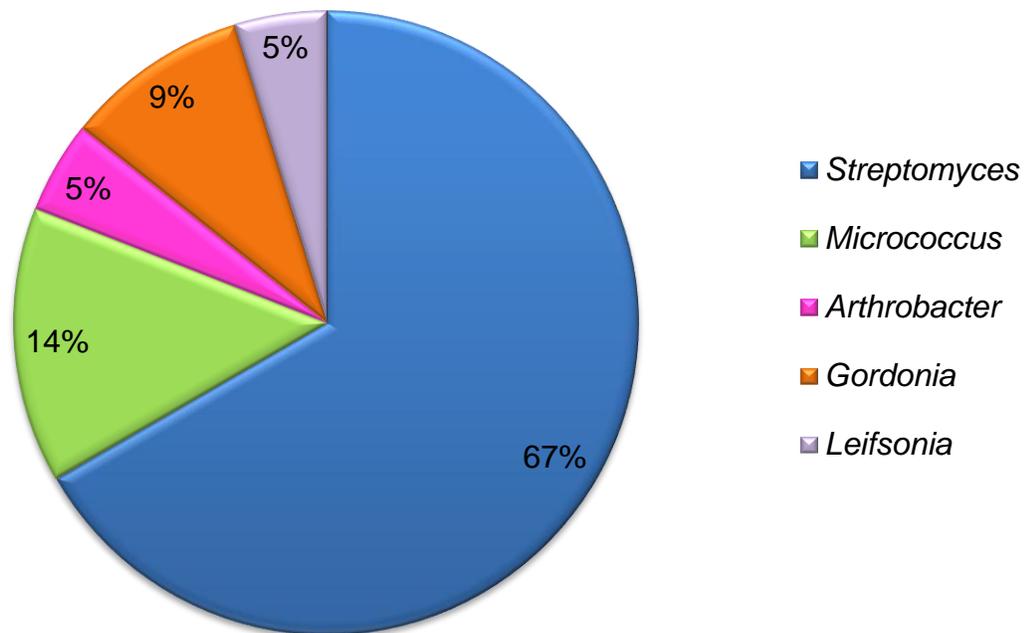


Tabla 4. Determinación taxonómica de las cepas del phylum *Actinobacteria* aisladas de 'aguas miel' con base en caracterización morfológica y molecular del gen 16S rRNA. Abreviaturas: MA – micelio aéreo, EPG – esporangióforo, EP – esporas, CCB – ciclo de crecimiento bacilococoide, MV – micelio vegetativo, C – cocos, CN – color naranja, CDF – conidióforos, CA – color amarillo, G – geosmina, ASR – Agrupación con secuencia de referencia.

| Cepa | Determinación | Evidencia | |
|---------|------------------------|-------------|-------------|
| | | Morfología | Molecular |
| MFSR-1 | <i>Streptomyces</i> sp | MA, EPG, EP | 98% I, ASR |
| MFSR-2 | <i>Streptomyces</i> sp | MA, EPG, EP | 99% I, ASR |
| MFSR-3 | <i>Arthrobacter</i> sp | CCB, MV | 99% I, ASR |
| MFSR-4 | <i>Micrococcus</i> sp | C, MV | 99% I, ASR |
| MFSR-5 | <i>Micrococcus</i> sp | C, MV | 99% I, ASR |
| MFSR-6 | <i>Streptomyces</i> sp | MA, EPG, EP | 99% I, ASR |
| MFSR-7 | <i>Streptomyces</i> sp | MA, EPG, EP | 99% I, ASR |
| MFSR-8 | <i>Gordonia</i> sp | CN, MV | 98% I, ASR |
| MFSR-9 | <i>Gordonia</i> sp | CN, MV | 99% I, ASR |
| MFSR-10 | <i>Streptomyces</i> sp | MA, CDF | 100% I, ASR |
| MFSR-11 | <i>Leifsonia</i> sp | CA, MV | 99% I, ASR |
| MFSR-12 | <i>Streptomyces</i> sp | MA, EPG, EP | ASR |
| MFSR-13 | <i>Micrococcus</i> sp | C, MV | ASR |
| MFSR-14 | <i>Streptomyces</i> sp | MA, CDF, G | 98% I, ASR |
| MFSR-15 | <i>Streptomyces</i> sp | MA, CDF, G | 97% I, ASR |
| MFSR-16 | <i>Streptomyces</i> sp | MA, EPG, EP | 99% I, ASR |
| MFSR-17 | <i>Streptomyces</i> sp | MA, EPG, EP | |
| MFSR-18 | <i>Streptomyces</i> sp | MA, CDF | |
| MFSR-19 | <i>Streptomyces</i> sp | MA, EPG, EP | 99% I, ASR |
| MFSR-20 | <i>Streptomyces</i> sp | MA, EPG, EP | 99% I, ASR |
| MFSR-21 | <i>Streptomyces</i> sp | MA, EPG, EP | 99% I, ASR |

Figura 5. Distribución de géneros de actinobacterias identificados con base en el gen 16S rRNA y características morfológicas.



2.3 CRIOPRESERVACIÓN DE CULTIVOS.

Las 21 cepas aisladas fueron criopreservadas en 20% glicerol de acuerdo al protocolo propuesto por Sambrook & Russell (2001). Las cepas fueron almacenadas a -70° C por triplicado en el cepario del Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Biología-UIS. Las cepas quedaron a disposición del macroproyecto en el cual se desea evaluar la producción de hidrógeno molecular en estas cepas.

3 DISCUSIÓN

En el presente estudio se aislaron 21 cepas de actinobacterias provenientes de 'aguas miel', de un cultivo de café orgánico de La Mesa de Los Santos (Santander). La caracterización morfológica confirmó que el 100% pertenece al phylum *Actinobacteria*; todas las cepas aisladas fueron Gram-positivas, de morfología variable. De 17 de ellas, se logró la identificación molecular y se corroboraron los taxones complementando con los datos morfológicos. Dos cepas exhibieron identidades de secuencia inferior a 95% y de otras dos, las secuencias fueron de mala calidad. Tomados en conjunto, los resultados arrojaron que en las 'aguas miel', del cultivo de café orgánico de La Mesa de Los Santos, coexisten representantes de al menos tres órdenes (*Micrococcales*, *Streptomyetales* y *Corynebacteriales*) y cinco géneros (*Streptomyces*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Leifsonia* y *Gordonia*).

Aunque efectuamos una búsqueda exhaustiva de reportes de actinobacterias provenientes de 'aguas miel', no encontramos estudios publicados al respecto. De esta manera, este estudio se puede considerar el primer reporte de la presencia de actinobacterias en 'aguas miel' y los grupos taxonómicos que componen esta comunidad.

Los resultados encontrados en este estudio muestran una composición de la comunidad de actinobacterias más rica, en comparación con los reportes de otros residuos cafeteros como lombricompostos del beneficiado húmedo del café (Blandón *et al.* 1999) y el procesamiento seco natural de café (Silva *et al.*, 2000 y 2008). Las razones de estas diferencias podrían ser las condiciones de las etapas del beneficiado (temperatura, humedad, pH, flora microbiana), calidad de higiene y las variedades de café procesadas (Silva *et al.*, 2000).

La presencia de los géneros aislados es coherente con la composición y propiedades fisicoquímicas de las 'aguas miel'. Por ejemplo, el género *Leifsonia* puede estar presente, como consecuencia de la acidificación del sustrato por fermentación natural (pH 6.3 a pH 4.1) (Avallone *et al.*, 2001); difícilmente crece a pH neutro (Goodfellow *et al.*, 2012). El género *Streptomyces* abunda, probablemente debido a la multiplicidad de características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas que puede presentar (Anderson y Wellington, 2001; Goodfellow *et al.*, 2012); de ahí su éxito para habitar en una amplia gama de ambientes, tanto terrestres como acuícolas (Flårdh y Buttner, 2009; Goodfellow *et al.*, 2012). Estos microorganismos juegan un papel importante en el reciclaje de la materia orgánica, degradando compuestos recalcitrantes, entre ellos celulosa, pectinas, lignocelulosa, xilosa, todos constituyentes del mucílago (Ventura, 2007; Goodfellow *et al.*, 2012).

Las características morfológicas descritas para los 21 aislados se complementaron con técnicas moleculares basadas en el gen 16S rRNA, para una identificación más precisa (Mignard y Flandrois, 2006; Petti, 2007). Se logró una identificación exitosa a nivel de género para la mayoría de las cepas aisladas.

Las regiones hipervariables del gen 16S rRNA utilizadas (Li *et al.*, 2009) fueron lo suficientemente informativas para la identificación de microorganismos del phylum *Actinobacteria* (i.e., V3 (433 – 497) y V5 (822 – 879)). La identificación de las cepas de *Streptomyces* se realizó mediante el par de oligonucleótidos 27F – 1492R; sin embargo, este par no funcionó para dos de ellas (MFSR-10 y MFSR-12). Esto pudo deberse a una mayor variabilidad de las secuencias nucleotídicas en el sitio de unión del oligonucleótido (Lilja T. 2013). No obstante, con el par de oligonucleótidos 338F – 907R se logró su identificación exitosa.

Las cepas MFSR-12 y MFSR-13 presentaron baja identidad (<95%), limitando su definición taxonómica. Su morfología es coherente con las propiedades de los

actinobacterias (e.g., micelio vegetativo ramificado y/o aéreo, esporangióforos y esporas) y aunque de todas maneras se agrupan con las actinobacterias (*Micrococcus* sp y *Streptomyces* sp), no podemos afirmar que realmente pertenezcan a estos géneros.

Para las cepas MFSR-17 y MFSR-18 no fue posible la identificación molecular. Lamentablemente las secuencias fueron ilegibles o muy cortas (<500 pb), problema ya reportado en otros estudios de identificación microbiana con el gen 16S rRNA (Janda y Abbott, 2007). Sin embargo, la morfología es muy propia de las actinobacterias y es casi válido especular que se trata del género *Streptomyces*.

El propósito de este estudio era el aislamiento e identificación de cepas de actinobacterias, en el marco de un macroproyecto que pretende evaluar la producción de hidrógeno molecular en este grupo bacteriano. De esta manera, concluimos que los objetivos se cumplieron aunque falta evaluar su eficiencia en la producción de H₂. Es recomendable que a los aislados que presenten una producción de H₂ interesante para los propósitos del macroproyecto, se les apliquen pruebas bioquímicas que ratifiquen la determinación taxonómica adelantada en este trabajo.

4 CONCLUSIONES

Se obtuvieron 21 aislados de actinobacterias a partir de las piscinas de tratamiento de mucílago de café orgánico ‘aguas miel’ de la Hacienda “El Roble”.

La identificación molecular de los 19 aislados fue exitosa con el uso de los 4 diferentes pares de oligonucleótidos del gen 16S rRNA, siendo coherente con las características morfológicas típicas de actinobacterias.

Los 21 aislados se distribuyeron en 5 géneros diferentes del phylum *Actinobacteria*, siendo *Streptomyces* el más representativo (67%).

Este trabajo es el primer reporte de la presencia de actinobacterias en ‘aguas miel’ y los grupos taxonómicos que componen esta comunidad.

Las 21 cepas están criopreservadas en los laboratorios del CINBIN y listas para la evaluación de la producción de H₂.

5 RECOMENDACIONES

Se recomienda analizar a partir de las cepas de actinobacterias aisladas, la capacidad de producción de moléculas como fuente de biogás.

Además, para las cepas que se destaquen en la producción de H₂, se recomienda implementar técnicas bioquímicas que permitan complementar la información obtenida.

BIBLIOGRAFÍA

ALFARO, M; RODRÍGUEZ, J. Impacto ambiental del procesamiento del café en Costa Rica. En: *Agronomía Costarricense*. Septiembre, 1994. vol. 18, no. 2, p. 217 – 225.

ALVAREZ, J; HUGH, S; CUBA, N; LOZA-MUIRGUÍA, M. Evaluación de un sistema de tratamientos de aguas residuales del prebeneficiado de café (*Coffea arabica*) implementado en la comunidad Carmen Pampa provincial Nor Yungas del departamento de La Paz. En: *Journal of the Selva Andina Research Society*. Julio, 2011. vol. 2, no. 1, p. 34 – 42.

ANDERSON, A; WELLINGTON, E. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. En: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. April, 2001, vol. 51, p. 797 – 814.

AVALLONE, S; GUIRAUD, P; GUYOT, B; OLGUIN, E; BRILLOUET, J. Polysaccharide constituents of coffee-bean mucilage. En: *Journal of Food Science*. November, 2000. vol. 65, no. 8, p. 1308 – 1311.

AVALLONE, S; GUYOT, B; BRILLOUET, J; OLGUIN, E; GUIRAUD, J. Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. En: *Current Microbiology*, April, 2001. vol. 42, no. 4, p. 252 – 256.

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.: *Associates*, 1992. 292 p.

BLACKWOOD, C; OAKS, A; BUYER, J. Phylum and class-specific PCR primers for general microbial community analysis. En: *Applied and Environmental Microbiology*. October, 2005. vol. 71, no.10, p. 6193 – 6198.

BLANDON, G; RODRÍGUEZ, N; DÁVILA, M. Caracterización microbiológica y físico-química de los subproductos del beneficio del café en proceso de compostaje. En: *Cenicafé*. Mayo, 1999. vol. 49, no. 3, p. 169 – 185.

CADENA, G. Desarrollos científicos de Cenicafé en la última década. En: *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias*. Marzo, 2005. vol. 29, no. 110, p. 89 - 99.

CENICAFE. Construyendo el modelo para gestión integrada del recurso hídrico en la caficultura colombiana. En: *Federación Nacional de Cafeteros*. Marzo, 2011. vol.1, no. 1, p. 1 – 91.

CHAKRAVORTY, S; HELB, D; BURDAY, M; CONNELL, N; ALLAND, D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. En: *Journal Microbiological Methods*. May, 2007. vol. 69, no. 2, p. 330 – 339.

EDGAR, R. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. En: *Nucleic Acids Research*. March, 2004. vol. 32, no. 5, p. 1792 – 1797.

ESQUIVEL, P; JIMENEZ, V. Functional properties of coffee and coffee by-products. En: *Food Research International*. May, 2012. vol. 46, no. 1, p. 488 – 495.

FLÄRD, K; BUTTNER, M. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. En: *Nature Reviews*. January, 2009. vol. 7, no. 1, p. 36 – 50.

Federación Nacional de Cafeteros de Colombia [en línea]. <http://goo.gl/s1pavg> [Citado el 14 de mayo del 2015]

FRANCO, M. Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Trabajo de doctorado. Granada.: Universidad de Granada. Facultad de Ciencias. Departamento de Fisiología Vegetal. 2008. 261 p.

GATHOGO, E; WAUGH, C; PERIÉ-CONCHA, N; REDPATH, M; LONG, P. Rapid detection of “rare” actinomycetes in environmental samples. En: *Biotechnology letters*. March, 2004. vol. 26, no. 1, p. 897 – 900.

GOODFELLOW, M; KAMPER, P; BUSSE, J; TRUJILLO, M; SUZUKI, K; LUDWING, W; WHITMAN, W. *Bergey’s manual of systematic bacteriology*. New York.: Springer, 2012. 2083 p.

GUO, X; XIA, X; TANG, R; WANG, K. Real-time PCR quantification of the predominant bacterial divisions in the distal gut of Meishan and Landrace pigs. En: *Anaerobe*. October, 2008. vol. 14, no. 2, p. 224 – 228.

HUBER, T; FAULKNER, G; HUGENHOLTZ, P. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. En: *Bioinformatics*. April, 2004. vol. 20, no. 4, p. 2317 – 2319.

JANDA, M; ABBOTT, S. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. En: *Journal of Clinical Microbiology*. September, 2007. vol. 45, no. 9, p. 2761 – 2764.

MEINTJES, K; DURAN, C; KEARSE, M; MOIR, R; WILSON, A; STONES, S; CHEUNG, M; STURROCK, S; BUXTON, S; COOPER, A; MARKOWITZ, S; THIERER, T; ASHTON, B; HELED, J. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. En: *Bioinformatics*. April, 2012. vol. 28, no.12, p. 1647-1649.

LI, H; ZHANG, Y; LI, D; XU, H; CHEN, G; ZHANG, C. Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* genes for fingerprinting of microbial communities in paddy soils. En: *Soil Biology & Biochemistry*. January, 2009. vol. 41, no. 1, p. 954 – 968.

LILJA, T. Isolating microorganisms from marine and marine-associated samples. Suecia, 2013, 38 p. Swedish University of Agricultural Sciences. No: 2013:9, ISSN: 1101-8151.

LUDWING, W; STRUNK, O; KLUGBAUER, S; KLUGBAUER, N; WEIZENEGGER, M; NEUMAIER, J; BACHLEITNER, M; SCHLEIFER, K. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis (review). En: *Electrophoresis*. April, 1998. vol. 19, no. 4, p. 554 – 568.

MATUK, V; PUERTA, G; RODRÍGUEZ, N. Impacto biológico de los efluentes del beneficio húmedo del café. En: *Cenicafé*. Enero , 1997. vol. 48, no. 4, p. 234 – 252.

MIGNARD, S; FLANDROIS, J. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment. En: *Journal of Microbiological Methods*. July, 2006. vol. 67, no. 1, p. 574 – 581.

MUYZER, G; WAAL, E; UITTERLINDEN, A. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. En: *Applied Environmental Microbiology*. March, 1993. vol. 59, no. 3 p. 695–700.

OTERO, V. Aislamiento, selección e identificación de actinomicetos, bacterias fotosintéticas no sulfurosas y bacterias ácidos lácticas con potencial biofertilizante, a partir de suelos asociados al cultivo de plátano en la Costa Atlántica Colombiana. Trabajo de maestría. Bogotá.: Colombia. Universidad Nacional de Colombia. 2011. 161 p.

PETTI, C. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. En: *Medical Microbiology*. March, 2007. vol. 44, no.1, p. 1108 – 1114.

PORETSKY, R; RODRIGUEZ, L; LUO, C; TSEMENTZI, D; KONSTANTINIDIS, K. Strengths and limitations of 16S rRNA gene amplicon sequencing in revealing

temporal microbial community dynamics. En: *PLoS ONE*. April, 2014. vol. 9, no. 4, p. 1 - 12.

PUERTA, G. Influencia del proceso del beneficio en la calidad del café. En: *Cenicafé*. Junio, 1999. vol. 50, no. 1, p. 78 – 88.

PUERTA, G. Efecto de enzimas pectolíticas en la remoción del mucílago de *Coffea arabica* L., según el desarrollo del fruto. En: *Cenicafé*. Abril, 2009. vol. 60, no. 4, p. 291 – 312.

RAMÍREZ, P; COHA, J. Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. En: *Revista Peruana de Biología*. Mayo, 2003. vol. 10, no. 1, p. 67 – 77.

REVOLLO, E; SERNA, O; HERNÁNDEZ, J. Caracterización de actinobacterias raras, degradadoras de lignocelulosa: Demostración de actividad lacasa en dos aislados de *Tsukamarella* sp y *Cellulosimicrobium* sp. En: *Revista Colombiana de Biotecnología*. Diciembre, 2012. vol. 14, no. 2, p. 70 – 80.

RODRÍGUEZ, N; ZAMBRANO, F. Los subproductos del café: Fuente de energía removable. En: *Avances técnicos - Cenicafé*. Marzo, 2012. vol. 70, no. 393, p. 1 – 8.

SAITOU, N; NEI, M. The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. En: *Molecular Biology and Evolution*. July, 1987, vol. 4, no. 4, p. 406 – 425.

SAMBROOK, J; RUSSELL, D. Molecular cloning: a laboratory manual. New York, USA.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 1983 p.

SCHAEFFER, A; FULTON, M. A simplified method of staining endospores. En: *Science*. February, 1993. vol. 77, no. 1990, p. 190 - 194.

SCHÄFER, C; FRIEDERICH, B; LENZ, O. Novel, oxygen-insensitive group 5 [NiFe]-hydrogenase in *Ralstonia eutropha*. En: *Applied and Environmental Microbiology*. June, 2013. vol.79, no. 17, p. 5137 – 5145.

SELVAMURUGAN, M; DORAISAMY, P; MAHESWARI, M. An integrated treatment system for coffee processing wastewater using anaerobic and aerobic process. En: *Ecological Engineering*. July, 2010. vol. 36, no. 12, p. 1686 – 1690.

SILVA, C; SCHWAN, R; SOUSA, E; WHEALS, A. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. En: *International Journal of Food Microbiology*. May, 2000. vol. 60, no. 1, p. 215 – 260.

SILVA, C; BATISTA, L; MAGALHAES, L; SOUZA, D; FREITAS, R. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. En: *Food Microbiology*. July, 2008. vol. 25, no. 1, p. 951 – 957.

STACKERBRANDT, 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.

VENTURA, M; CANCHAYA, C; TAUCH, A; CHANDRA, G; FITZGERALD, G; CHATER, K; SINDEREN, D. Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the evolutionary history an ancient phylum. En: *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. September, 2007. vol. 71, no. 3, p. 495 – 548.

VOS, M; QUINCE, C; PIJL, A; HOLLANDER, M; KOWALCHUK, G. A comparison of *rpoB* and 16S rRNA as markers in pyrosequencing studies of bacterial diversity. En: *PLoS ONE*. February, 2012. vol. 7, no. 2, p. 1 – 9.

WANG, Y; ZHANG, Z; RUAN, J; WANG, Y.M; ALI, S. Investigation of actinomycete diversity in the tropical rainforest of Singapore. En: *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. June, 1999. vol. 23, no. 3, p. 178 – 187.

WIRTH, R; KOVACS, E; MAROTI, G; BAGI, Z; RAKHELY, G; KOVACS, K. Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. En: *Biotechnology for Biofuels*. May, 2012. vol. 5, no. 1. p. 1 – 16.