



FACULTAD DE NATURALES

SEDE TRELEW

**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE ACTINOMICETOS
TERRESTRES CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA CONTRA BACTERIAS
MULTIDROGO-RESISTENTES”**

Seminario para acceder a la

LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Alumna ROMINA BELÉN PARADA

Directora-Asesora Dra. MARISOL VALLEJO

Co-asesor JOSÉ SARAVIA

Año 2016

TABLA DE CONTENIDO

Agradecimientos	1
Resumen.....	3
1. Introducción	4
1.1. Generalidades y clasificación taxonómica de los actinomicetos.....	4
1.2. Actinomicetos productores de compuestos bioactivos.....	7
1.3. Características genéticas e importancia del género Streptomyces	7
1.3.1. Ciclo de vida y organización genética.....	7
1.4. Características de los grupos de genes involucrados en la biosíntesis de metabolitos secundario	11
1.5. Producción de metabolitos secundarios de Streptomyces	12
1.6. Clasificación de metabolitos secundarios.....	13
1.7. Biosíntesis	13
1.8. Patógenos multidrogo-resistentes.....	15
2. Objetivos	17
2.1. Objetivo general	17
2.2. Objetivos particulares.....	17
3. Materiales y Métodos	18
3.1 Origen de las muestras	18
3.2 Aislamiento de los actinomicetos terrestres	18
3.3 Caracterización morfológica de los actinomicetos aislados.....	19
3.3.1. Caracterización Macroscópica	19

3.3.2. Caracterización Microscópica.....	19
3.4. Conservación.....	19
3.5. Cepas indicadoras.....	20
3.6. Determinación de la actividad antibacteriana	20
3.7. Caldo de fermentación y prueba de su actividad inhibitoria	21
3.8. Título de la actividad antimicrobiana.....	21
3.9. Extracción de ADN	22
3.10. Identificación genotípica	23
3.10.1 Amplificación por PCR.....	23
3.10.2. Análisis de las secuencias del ADNr 16S	25
3.11. Análisis filogenético.....	26
3.12. Detección de genes de metabolitos secundarios.....	26
4. Resultados	28
4.1. Origen de las muestras	28
4.2 Aislamiento de los actinomicetos terrestres	28
4.3. Caracterización morfológica de los actinomicetos aislados.....	28
4.4. Determinación de la actividad antibacteriana	34
4.5. Caldo de fermentación y prueba de su actividad inhibitoria	35
4.6. Título de la actividad antimicrobiana.....	36
4.7. Identificación genotípica.....	36
4.7.1 Análisis de las secuencias del ADNr 16S	36
4.8. Análisis filogenético.....	37
4.9. Detección de genes de metabolitos secundarios.....	39

5. Discusión.....	41
6. Conclusión.....	45
7. Divulgación de Resultados.....	47
7. Bibliografía	48
ANEXOS.....	56
Anexo I. Composición de los distintos medios de cultivos.....	56
Anexo II. Marcador de peso molecular MA12 LADDER de MASA.	57
Anexo III. Número de acceso de las secuencias de ADNr 16S de las cepas de la base de datos Ribosomal Database Project (RDP).	58
Anexo IV. Números de acceso provisorios a la base de datos NCBI, correspondiente a la selección de actinomices terrestres.	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relación intraclase del phylum Actinobacteria basada en la comparación de las secuencias del ARNr 16S. (Zhi <i>et al.</i> , 2009).....	6
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i> . (Brooks <i>et al.</i> , 2012).....	8
Figura 3. Representación circular del genoma de <i>S. coelicolor</i> . Modificado de Bentley <i>et al.</i> (2002).	10
Figura 4. Porcentaje de las muestras de suelo en relación a su origen geográfico.....	28
Figura 5. Porcentaje de las cepas con y sin actividad antimicrobiana.	34
Figura 6. Actividad inhibitoria frente a tres de las cepas testigos MDR; EVR (van A y van B) y SAMR.	34
Figura 7. Árbol filogenético parcial basado en la comparación de secuencias del ADNr 16S entre los aislados obtenidos y las especies validadas para cada género.	38

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de los cromosomas secuenciados del género <i>Streptomyces</i>	11
Tabla 2. Secuencias de los cebadores universales 27F/1492R.....	23
Tabla 3. Concentración de los reactivos para la amplificación del gen ARNr 16S.....	23
Tabla 4. Protocolo para la amplificación del gen ARNr 16S.....	25
Tabla 5. Cebadores empleados para la reacción de PCR.	26
Tabla 6. Descripción macro y microscópica (Coloración de Gram y Microcultivo) de las cepas de actinomicetos seleccionadas. Imágenes microscópicas con aumento 1000X.....	30
Tabla 7. Selección de cepas actinomicetos con actividad antimicrobiana frente a bacterias MDR.....	35
Tabla 8. Actividad inhibitoria mediante la prueba de difusión en placa.	36
Tabla 9. Resultados del análisis BLASTN de las secuencias de ADNr 16S de la selección de cepas de actinomicetos.....	37
Tabla 10. Amplificaciones de los genes NRPS, PKASI y PKSII.....	39

Agradecimientos

Este trabajo final de licenciatura se realizó en el marco del Proyecto “Selección de actinomicetos productores de metabolitos antagónicos contra patógenos humanos multidrogo-resistentes”. Proyectos Bilaterales Argentina-Perú. Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva y el Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC).

Por la colaboración en la recolección de muestras a la Dra. Cynthia González, Lic. Cecilia Ibáñez, Prof. Jorge León y Nadia Galindo, y a mis hermanos Carlos y Silvana.

Por la provisión de cepas indicadoras a los Lic. Fabián Aguirre y Pablo Ledesma.

A Ula por su colaboración, durante su pasantía, con la realización de los microcultivos, por compartir sus experiencias, y principalmente por la amistad que me brindó en tan poco tiempo.

A Marisol y Rogelio por haber confiado en mí, dándome no sólo la posibilidad de investigar un tema tan interesante, sino también de presentarlo en Jornadas y Congresos haciéndome sentir parte de un pequeño gran grupo de investigadores. Por todo este tiempo compartido, por aconsejarme cuando lo necesitaba.

A mi mamá Silvia, a mí papa Luis les agradezco inmensamente por todo su constante apoyo, por aceptar mis decisiones, por enseñarme que con esfuerzo se logran grandes cosas, por darme ánimos en los momentos más difíciles, por su confianza y tanto amor. A mí hermana, por ser mi cómplice, por estar siempre al pie del cañón para lo que necesite, por guiarme en el camino de la vida, por tanto cariño. A mí hermano, por sacarme una sonrisa hasta en los peores momentos, por enseñarme que siempre hay una salida, que lo malo tiene su lado bueno, por su cariño. Les agradezco de corazón porque a pesar de la distancia siempre estuvieron presentes.

A mi tía Mary, mi tío Carlos, mi madrina Nelly y mi padrino Pepe, mi primo Diego por estar firmes en los momentos más difíciles, por levantarme el ánimo, por estar siempre dispuestos, por sus consejos, por tantos momentos de risa, llanto y emociones compartidas, por hacerme sentir como en casa.

A todas aquellas personas con las que me fui cruzando a lo largo de la carrera, en las cursadas, en los pasillos, almuerzos en el comedor y salidas. A Magalí, una amiga de fierro, por ser incondicional, por abrirme las puertas de su casa y hasta compartir su familia; a Diana, Jessica, Bárbara, Nadine, Damaris, Carmela, Giselle, Cristina, Brenda, por estar

cuando las necesite, por sus consejos, por compartir tantos momentos lindos a lo largo de estos años. A mis amigos de siempre Nahir, Tania, Silvi, Mica, Emilia, Martín (Caballero), Nico y Gera, porque a pesar de los años y la distancias están presente; y a todas esas personas que se fueron perdiendo pero han sido muy importantes en su momento.

Para finalizar agradecer a todos aquellos profesionales que han estado presentes a lo largo de estos años, y que han contribuido en mi formación.

A TODOS MUCHAS GRACIAS...

Resumen

Los actinomicetos representan un grupo ubicuo y heterogéneo de microorganismos Gram positivos (alto contenido G+C), son abundantes en suelos y constituyen entre el 20 y 60 % de su población microbiana total. Mediante los análisis filogenéticos se determinó que las actinobacterias constituyen el orden Actinomycetales, que en la actualidad comprende 63 géneros. Tradicionalmente los actinomicetos han constituido una fuente importante de nuevos metabolitos secundarios (MS) con actividad biológica. Entre ellos se destacan los antibióticos policétidos, cuya biosíntesis depende del complejo multienzimático policétido sintasa (PKS); además se encuentran los péptidos no ribosomales (NRP), sintetizados por una o más péptido sintasas no ribosomal (NRPS). En la actualidad, uno de los principales problemas en la salud pública es el aumento de la resistencia antimicrobiana y la incidencia de patógenos multidrogo-resistentes (MDR). Este fenómeno induce la búsqueda de nuevos antibióticos que permitan mayor eficacia para la salud humana.

Este trabajo tuvo como objetivo aislar y seleccionar cepas de actinomicetos terrestres productores de MS activos contra patógenos MDR. En total se aislaron 234 cepas de actinobacterias, se seleccionaron 13 que presentaron actividad antimicrobiana en medio sólido contra *Enterococcus* resistente a vancomicina (van A y van B) y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Además, se evaluó la inhibición contra *Listeria monocytogenes*, *Cronobacter sakazakii*, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa tipo A, *Klebsiella pneumoniae* (BLEE), y *Pseudomona aeruginosa* carbapenemasa tipo B. Del total de actinobacterias seleccionadas, sólo la cepa AC69C produjo metabolitos bioactivos en medio líquido con actividad antagónica frente a los patógenos Gram positivos evaluados. A partir del análisis filogenético se determinó que, de las 13 seleccionadas, 12 cepas pertenecían al género *Streptomyces* y sólo una a *Actinomadura*. Los genes NRPS y PKS-I se detectaron en las cepas de actinomicetos seleccionadas en un 30,8 % y 15,4 % respectivamente, mientras que no se detectó la presencia del gen PKS II. Se determinó que no existe una relación entre la actividad antimicrobiana y la presencia de los genes (NRPS, PKS-I y PKS-II) de los actinomicetos seleccionados. Los resultados de este trabajo sugieren que la comunidad cultivable de actinomicetos es diversa y constituye una potencial fuente para el desarrollo de nuevos antibióticos.

1. Introducción

1.1. Generalidades y clasificación taxonómica de los actinomicetos

Antiguamente los actinomicetos se clasificaron como “hongos radiados”, debido a que su morfología y desarrollo presenta gran similitud con los demás hongos dotados de un micelio verdadero. En la primera clasificación formal, a éstos microorganismos se los consideró como un puente evolutivo entre las bacteria y hongos (Waksman & Henrici, 1943). No obstante, en la actualidad los actinomicetos están incluidos en el dominio Bacterias debido a que presentan propiedades relativas a éste, como ausencia de la membrana nuclear, sus hifas poseen diámetros inferiores a las de los hongos (0,5- 2,0 μm), la pared está compuesta de peptidoglucano, presentan resistencia a los antifúngicos, pero son sensibles a la lisozima y agentes antibacterianos, y por último la disposición del material genético es típicamente procariota (Bergey & Hendricks, 1974; Correa, 2008).

Estos microorganismos filamentosos crecen en forma de red llamado micelio, exhibiendo dos tipos de micelios denominados aéreo y de sustrato (Correa, 2008; Coyne, 2000). Una característica particular de las Actinobacterias es la reproducción, presentan esporas que son producidas por las hifas especializadas muchas de las cuales se desarrollan sobre el filamento aéreo. Este tipo de bacterias filamentosas son Gram positivas y su composición de bases de ADN es 63 a 78% de guanina más citosina (G + C) (Espinosa, 2011).

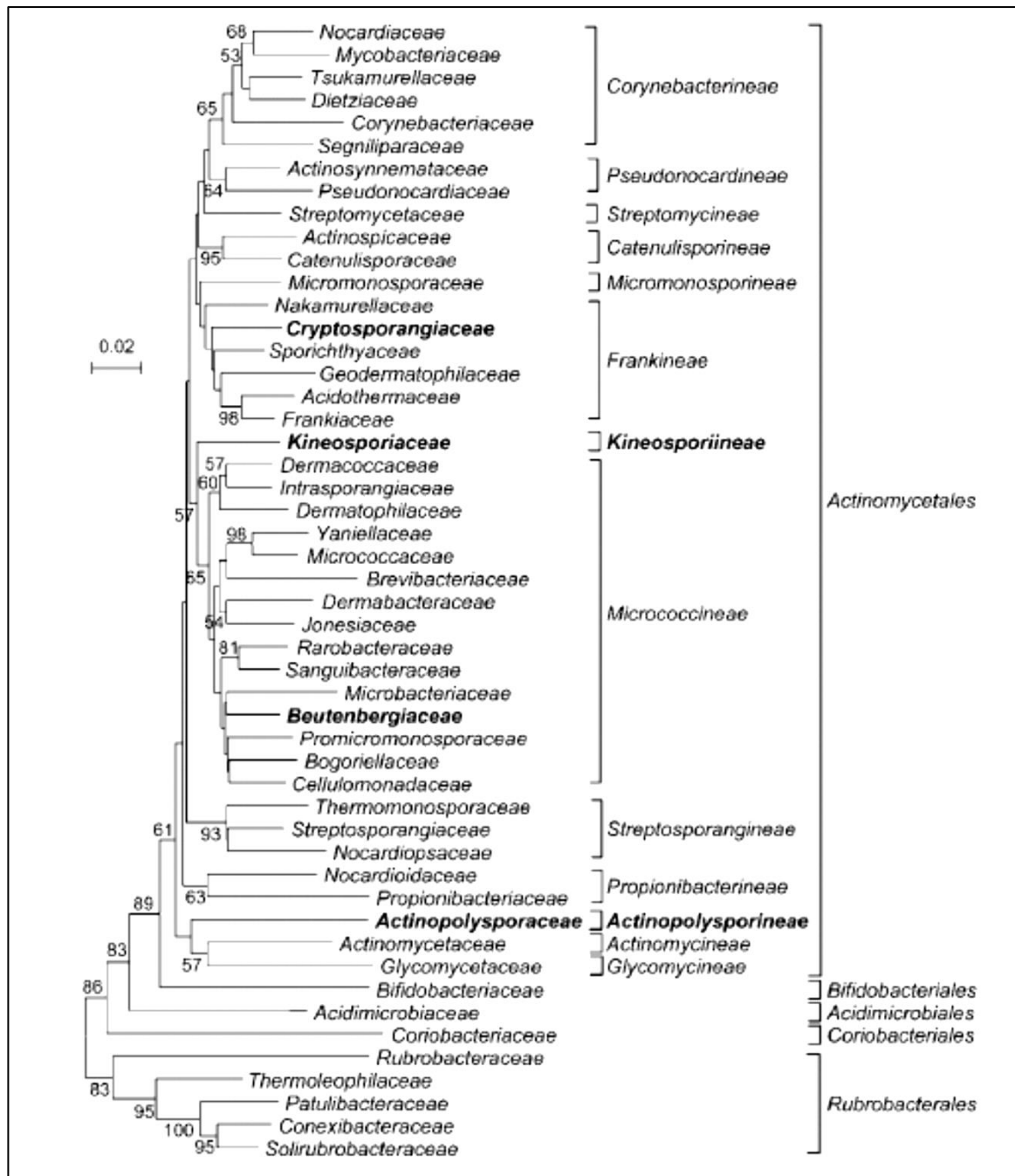
Actualmente existen diversas maneras de clasificar a estos microorganismos, ya sea por sus propiedades morfológicas (macro-microscópicas), por la utilización de criterios basados en quimiotaxonomía y por la aplicación de técnicas moleculares que ha contribuido extensamente al análisis de los genomas de los actinomicetos. La subunidad 16S del ARNr es la más utilizada para estos análisis, contiene información suficiente para llevar a cabo comparaciones significativas, ya que presenta regiones altamente conservadas y regiones muy variables, que permiten efectuar relaciones filogenéticas entre taxones cercanos y distantes (Correa, 2008; Rodicio & Mendoza, 2004). Mediante los análisis filogenéticos se determinó que las actinobacterias constituyen el orden de Actinomycetales, el cual comprende 63 géneros, siendo el más importante dentro del filo las Actinobacterias (Zhi *et al.*, 2009) (Figura 1).

Los Actinomicetos conforman un grupo ubicuo, representan entre un 20 a 60% de la población microbiana total de los suelos, también pueden encontrarse en ambientes acuáticos tanto dulces como marinos (Hakvåg *et al.*, 2008; Kennedy *et al.*, 2009; Leiva *et al.*, 2004). En general, son

considerados microorganismos saprófitos debido a que cumplen un importante rol en la descomposición de la materia orgánica y el ciclo del carbono mediante la producción de enzimas hidrolíticas y ligninolíticas, entre otras (Hogan, 2010; Usha *et al.*, 2011).

Dentro de este grupo microbiano, algunas especies liberan geosmina (1,10-dimetil-9-decadiol), sustancia química de naturaleza sesquiterpenoide (Correa, 2008; Coyne, 2000) que permanece en la tierra hasta que caen las primeras gotas de lluvia, siendo arrastrada por la humedad y haciendo que el aire adquiera el olor característico a tierra mojada. El ser humano percibe la geosmina en concentraciones de hasta 1 parte por cada 1.000 millones, lo que la convierte en una de las moléculas más olorosas que existen (Gerber & Lechevalier, 1965). Los camellos, algunos insectos y las lombrices se ven atraídos por su aroma ya que es indicativo de la presencia de agua.

Figura 1. Relación intracласe del phylum Actinobacteria basada en la comparación de las



secuencias del ARNr 16S. (Zhi *et al.*, 2009).

Las actinobacterias son consideradas heterótrofas, por lo tanto pueden utilizar como fuente de carbono diversos compuestos moleculares orgánicos tales como ácidos, azúcares, polisacáridos, hidrocarburos alifáticos, lípidos y proteínas. En general estos microorganismos son aerobios (oxidativos), aunque algunos de ellos son anaerobios facultativos u obligados (fermentativos) (Logan, 1994); soportan ambientes alcalinos (pH 8) y demuestran baja tolerancia a los ambientes ácidos. La mayoría son mesófilos, ya que su crecimiento óptimo se registra entre 25 y

30 °C, pero existen especies como *Streptomyces sp.*, *Thermomonospora sp.* y *Thermoactinomyces sp.*, que pueden crecer entre 55 y 66 °C (Correa, 2008; Coyne, 2000).

1.2. Actinomicetos productores de compuestos bioactivos.

Los microorganismos viven en ambientes naturales, donde su crecimiento es afectado tanto por interacciones con otras poblaciones (sinérgicas, antagónicas, etc.) como por las características físicas y químicas de su entorno. Los actinomicetos presentan una elevada actividad metabólica, que comúnmente está acompañada por la producción de metabolitos secundarios (MS) con gran diversidad química y actividad biológica, primordiales para su supervivencia (González *et al.*, 2005; Martínez & Moreno-Enríquez, 2007).

1.3. Características genéticas e importancia del género *Streptomyces*

El género *Streptomyces* se encuentra entre las bacterias más complejas, puede ser definido por sus características genéticas y quimiotaxonómicas, tales como las secuencias de ARN ribosomal 16S, composición de la pared celular, patrones de lípidos y ácidos grasos (Nedal, 2007). Dentro de las actinobacterias, este género es uno de los más numerosos y más estudiados. Se han descrito más de 500 especies y subespecies que aparecen reflejadas y se van actualizando en la página web: <http://www.bacterio.cict.fr/s/streptomycesb.html>.

Este género es capaz de sintetizar una gran variedad de compuestos que presentan un amplio rango de actividad y que ha permitido a la industria la producción de antibióticos, inmunosupresores, agentes anticancerígenos, promotores del crecimiento, antihelmínticos, herbicidas, antifúngicos, etc. (Demain, 2002).

1.3.1. Ciclo de vida y organización genética

El género *Streptomyces* tiene como hábitat principal el suelo, su crecimiento está acoplado con la producción abundante de enzimas hidrolíticas extracelulares y su ciclo de vida es muy diferente al del resto de las bacterias (Figura 2).

A partir de la espora en condiciones favorables, se forma el tubo germinativo que da lugar al micelio sustrato. En respuesta a la limitación de nutrientes se forma el micelio aéreo y las hifas que lo forman se segmentan en partes uninucleadas que dan origen a una nueva espora, cerrándose el ciclo.

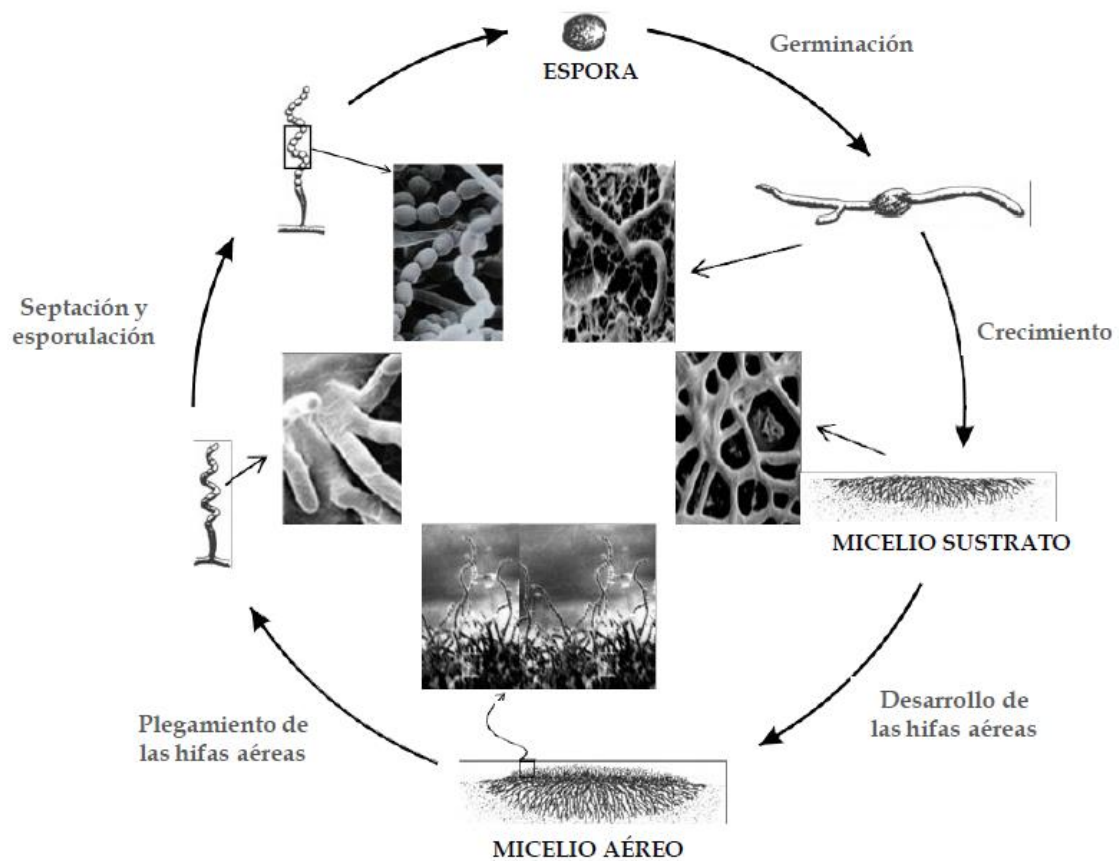


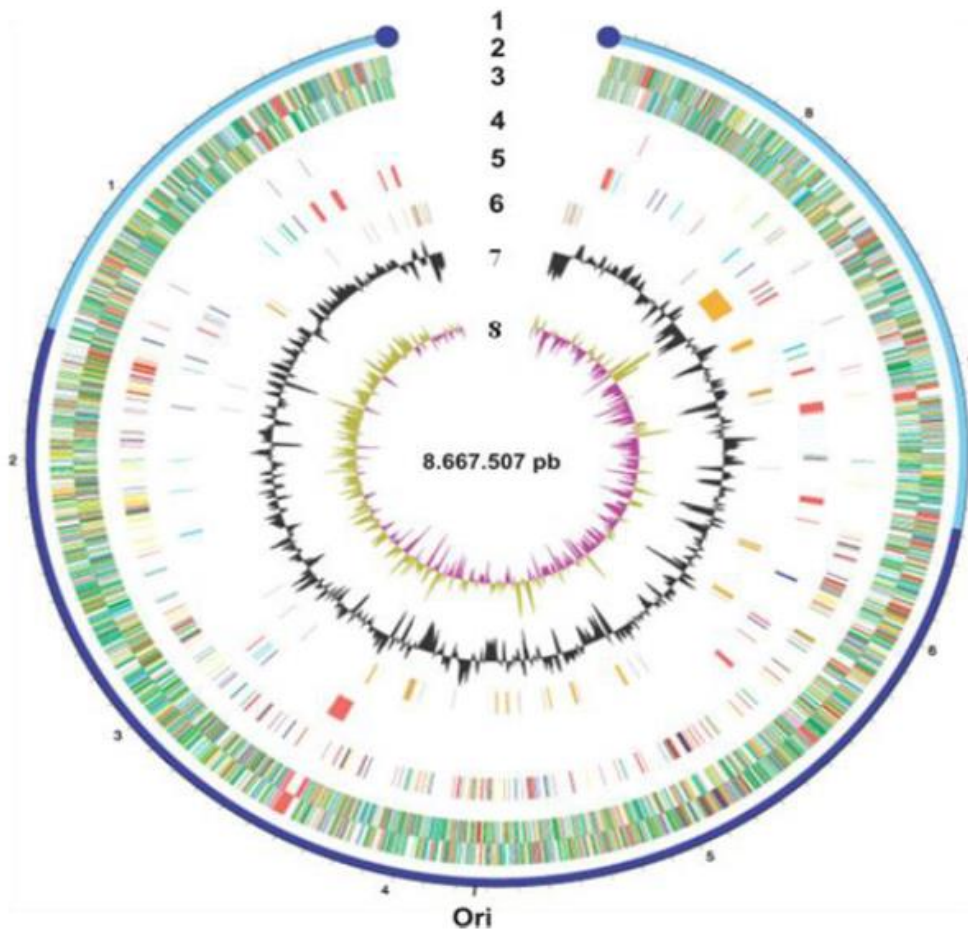
Figura 2. Ciclo de vida de *Streptomyces*. (Solera Segura, 2014)

La caracterización de diferentes cepas de *Streptomyces* ha revelado la presencia de un cromosoma lineal, con un tamaño de alrededor de 8 Mb. Este tamaño cromosómico es grande si lo comparamos con otras bacterias mejor conocidas como *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, estas características hacen del cromosoma de *Streptomyces* único en estructura y tamaño (Omura *et al.*, 2001). Se piensa, que su gran tamaño puede deberse a la presencia de regiones no codificantes, repeticiones de ADN en tándem y duplicaciones de genes con la misma función aparente.

La secuenciación de genomas completos de organismos como *S. coelicolor* (Bentley *et al.*, 2002), *S. avermitilis* (Ikeda *et al.*, 2003), *S. griseus* (Ohnishi *et al.*, 2008), *S. clavuligerus* (Medema *et al.*, 2010) y *S. tsukubaensis* (Barreiro *et al.*, 2012), ha revelado que el cromosoma se encuentra organizado genéticamente con una región central de 6 Mb y dos brazos terminales

de 2 Mb, aproximadamente (Figura 3). En el núcleo central se localizan mayoritariamente genes esenciales conservados, implicados en la biosíntesis de macromoléculas, el metabolismo primario y la división celular, mientras que en los brazos se concentran genes en su mayoría no esenciales, relacionados con el metabolismo secundario y la síntesis de enzimas hidrolíticas, y albergan en su mayor parte genes característicos de cada especie (Bentley *et al.*, 2002; Choulet *et al.*, 2006; Ikeda *et al.*, 2003; Ohnishi *et al.*, 2008). Los extremos del cromosoma contienen secuencias repetidas e invertidas denominadas TIR (Terminal Inverted Repeat), cuyo tamaño varía, según la especie, entre 24 y 600 kb (Volf & Altenbuchner, 1998).

Figura 3. Representación circular del genoma de *S. coelicolor*. Modificado de Bentley *et al.*



(2002).

En el círculo externo (1) se representa esquemáticamente la región central o núcleo (línea en azul oscuro) y los brazos terminales (líneas en azul claro) del cromosoma, en cuyo extremo se encuentran las proteínas terminales. En los círculos 2 y 3 se muestran todos los genes, coloreados según su función (negro: metabolismo energético, rojo: metabolismo secundario y transferencia de información, amarillo: metabolismo primario, verde claro: desconocida, azul claro: reguladores). En el círculo 4 se indican genes implicados en procesos esenciales para la célula: replicación del DNA, transcripción, traducción, división celular. En el círculo 5, se indican en rojo los genes del metabolismo secundario, en azul claro, exoenzimas; en azul oscuro, conservones; en verde, proteínas de vesículas de gas. Los transposones (marrón) y los genes adquiridos por transferencia lateral (naranja) se muestran en el círculo 6. Por último, el círculo 7 muestra el contenido en G+C, y el círculo 8 muestra el sesgo GC, apareciendo en morado los valores menores a 1, y en caqui los valores mayores que 1.

Según la base de datos Genomes Online Database (GOLD), existen en la actualidad 146 proyectos de secuenciación de genomas de especies de *Streptomyces*, incluyendo 15 genomas totalmente secuenciados y 128 en proceso de secuenciación, todo esto gracias a la aparición de nuevas y rápidas tecnologías como la pirosecuenciación. En la tabla 1 se presenta una relación comparativa entre algunos de los diferentes genomas secuenciados de *Streptomyces*.

Tabla 1. Características de los cromosomas secuenciados del género *Streptomyces*.

Especie	Cromosoma	Longitud (pb)	Contenido de G+C (%)	*ORFs	Genes del metabolismo secundario	Referencia
<i>S. coelicolor</i>	lineal	8.667.507	72,1	7.825	20 grupos	Bentley <i>et al.</i> , 2002
<i>S. avermitilis</i>	lineal	9.025.608	70,7	7.574	30 grupos	Ikeda <i>et al.</i> , 2003
<i>S. griseus</i>	lineal	8.545.929	72,2	7.138	34 grupos	Ohnishi <i>et al.</i> , 2008

*ORFs: marco de lectura abiertos

Los progresos de la biotecnología moderna han abierto nuevas perspectivas para el uso de microorganismos como productores de metabolitos con diversas aplicaciones. Actualmente existen numerosos grupos de investigación dedicados a la búsqueda de nuevos metabolitos, principalmente de origen actinomicetal, por su habilidad para producir una gama muy variada de compuestos bioactivos de importancia médica y de alto valor comercial para la industria farmacéutica (Espinosa, 2011). Se ha demostrado que muchos de ellos son productores de MS con actividad antimicrobiana, antiparasitaria, antiviral, antitumoral, citotóxica, entre otros cuyas estructuras químicas son únicas (Prashith *et al.*, 2010).

Los antibióticos son el grupo de MS más estudiados debido a su impacto sobre la salud (Strohl *et al.*, 1991) y economía de la sociedad (Martínez & Moreno-Enríquez, 2007). Se ha estimado que las especies de *Streptomyces* producen más del 50% del total de los 12.000 antibióticos microbianos que se han descubierto en los últimos 50 años, otro 11% es producido por otros actinomicetos (Strohl, 1997).

1.4. Características de los grupos de genes involucrados en la biosíntesis de metabolitos secundario

Los genes que participan en la biosíntesis de MS representan un alto porcentaje del genoma y debido a esto se han mapeado algunos grupos que, a diferencia de los genes del metabolismo primario, se han caracterizado por estar ordenados en regiones continuas definidas. Lo importante de esta organización es que permite la detección y aislamiento de rutas biosintéticas completas. Los grupos de genes “clusters” típicamente están compuestos por hasta docenas de genes requeridos para la síntesis de un metabolito específico, el cual contiene genes para el ensamblaje de la cadena, modificaciones y regulación.

El análisis de los diversos clusters de genes para la biosíntesis de antibióticos ha mostrado la presencia de genes de resistencia asociados a los clusters de biosíntesis (Sletta *et al.*, 2005).

1.5. Producción de metabolitos secundarios de Streptomyces

El metabolismo primario coincide con la fase de crecimiento exponencial y se puede definir como una serie de reacciones enzimáticas interrelacionadas que facilitan la energía, los intermediarios biosintéticos y las macromoléculas clave necesarias para las células vivas (Turner, 1973). Como resultado de un sistema metabólico finamente regulado, los metabolitos primarios raramente se acumulan.

El metabolismo secundario se ha definido como el conjunto de rutas que determinan la producción de una serie de compuestos que, sin resultar esenciales para la vida ni para el crecimiento de los organismos que los producen, confieren a estos ventajas ecológicas (Challis & Hopwood, 2003). Los MS son compuestos que se caracterizan porque:

- 1) no son esenciales para el crecimiento o la supervivencia del organismo productor y son, generalmente, específicos de cada cepa;
- 2) poseen una gran variedad de estructuras químicas y de actividades biológicas;
- 3) se sintetizan generalmente durante la fase estacionaria de crecimiento o de diferenciación morfológica a partir de metabolitos primarios o de intermediarios de los mismos por medio de vías únicas;
- 4) su síntesis se encuentra regida por agrupaciones de genes con mecanismos reguladores que coordinan el nivel de expresión con la fase fisiológica del organismo productor (Challis & Hopwood, 2003).

El suelo, principal hábitat natural de los estreptomicetos, es un medio muy cambiante. La capacidad de las especies de *Streptomyces* para producir antibióticos y otros MS ha podido suponer una ventaja evolutiva, facilitando su adaptación a las diferentes y variables situaciones de estrés físico, químico o biológico, que tienen lugar en este hábitat. Estas ventajas selectivas permiten explicar los mecanismos de acción que presentan, la amplia variedad de sus estructuras químicas, el importante gasto energético que supone para el organismo que los produce y el elevado porcentaje del genoma que se dedica a su producción, en torno al 20 % (Challis & Hopwood, 2003).

Una característica importante de los microorganismos productores de antibióticos es la de haber desarrollado varios mecanismos para su protección frente a la acción tóxica de los antibióticos sintetizados endógenamente, dentro de los que podemos mencionar las modificaciones en la estructura del antibiótico en el interior de la célula, la modificación de los sitios de acción y el flujo activo de moléculas de antibióticos (Sletta *et al.*, 2005).

1.6. Clasificación de metabolitos secundarios

Sobre la base de su estructura química los MS se clasifican en:

-Aminoglucósidos: son amino-azúcares unidos a un aminociclitol. En este grupo se encuentran la kanamicina, estreptomicina, higromicina, gentamicina, etc.

-Nucleosídicos: son compuestos que por su estructura química actúan como análogos de los nucleósidos que componen a los ácidos nucleicos. Dentro de los nucleósidos producidos por actinomicetos se destaca la puromicina.

-Peptídico: son compuestos formados por cadenas de aminoácidos sintetizadas en su mayoría mediante péptido sintetasas independientes de ribosomas, que sufren modificaciones postraduccionales y procesamientos proteolíticos que dan lugar a estructuras muy diversas. En este grupo se destaca la bacitracina y gramicidina.

-Glicopéptidos: son una clase de péptidos que contienen azúcares ligados a aminoácidos. Se los utiliza como antibióticos, ya que actúan inhibiendo la síntesis de peptidoglucano en un paso metabólico diferente a los agentes β -lactámicos. En este grupo se encuentra la vancomicina y teicoplanina.

- β -lactámicos: compuestos que poseen en su estructura un anillo β -lactámico (penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, carbacefem, carbapenems e inhibidores de la β -lactamasa).

-Policétidos: son compuestos con una gran diversidad estructural y que son sintetizados por las enzimas denominadas policétido sintetasas, en este grupo se engloban compuestos como la actinorrudina, anfotericina, pimaricina, nistatina, etc.

1.7. Biosíntesis

Los antibióticos policétidos son sustancias sintetizadas principalmente por actinomicetos, aunque también son sintetizadas por plantas y hongos. La biosíntesis se inicia con la

construcción de una cadena carbonada originada por la condensación de unidades de ácidos carboxílicos. Las unidades de construcción pueden ser variadas, de acetato, propionato, butirato, donde cada unidad se ensambla de tal forma que proporciona dos átomos de carbono a la estructura final.

Los policétidos son sintetizados por complejos enzimáticos denominado policétido sintasas (PKSs). Estructuralmente las PKSs son enzimas multifuncionales cuya actividad catalítica comprenden aciltransferasa (AT), cetosintasa (KS), proteína transportadora de los grupos acilo (ACP), cetoreductasa (KR), deshidrogenasa (DH) y enoilreductasa (ER) (Ayuso-Sacido & Genilloud, 2004; Sanz, 2005). La diversidad de los policétidos depende de cuatro factores: el tipo de policétido precursor, las unidades de iniciación y extensión, el número de unidades ensambladas y las modificaciones posteriores del precursor. Consecuentemente las PKSs se han clasificado en diferentes grupos de acuerdo con sus secuencias y estructuras primarias, así como la naturaleza de las unidades de elongación que utilizan en el montaje de la cadena policetónica; se dividen en PKSs Tipo I, II y III; siendo descritas en el sistema bacteriano (Baerson & Rimando, 2007; Shen, 2003).

Las PKSs Tipo I (PKS-I), implicadas en la biosíntesis de los policétidos poliéteres y macrólidos, se componen de varias enzimas multifuncionales, cada una de las cuales presenta diferentes dominios catalíticos, ubicados en el orden preciso en que van a ser utilizadas en cada ciclo de elongación de la cadena policetónica. Por otra parte las PKSs Tipo II (PKS-II), conformadas por varias proteínas en un complejo multienzimático, actúan de manera reiterada para la formación de la cadena; son responsables de los policétidos aromáticos. Además de la diferencia estructural que existe entre las PKSs Tipo I y Tipo II, el grado de complejidad genético entre ellas también es distinto. Mientras que las PKSs Tipo II se encuentran codificadas en pocos miles de nucleótidos en el genoma, las PKSs Tipo I son extremadamente complejas, llegando a ocupar varias decenas de miles de nucleótidos con unidades secuenciales repetidas en el gen que dan lugar a una organización conocida como modular. Por último las PKSs Tipo III (PKSIII) representan un subtipo de enzimas menos complejas que las dos anteriores, en cuanto a su estructura y su acción catalítica. Estas últimas, al igual que las PKSII actúan en forma repetida para formar policétidos aromáticos monocíclicos o bicíclicos. Otra diferencia es que las PKSs Tipo I y II utilizan una proteína transportadora de grupos acilo (ACP) para activar los sustratos acil-CoA y conducir los intermediarios policétidos en formación, mientras que PKSIII actúa directamente sobre el sustrato acil-CoA sin depender de la ACP (Shen, 2003).

Los péptidos no ribosomales (NRP) son usualmente producidos como MS por diversos microorganismos tales como bacterias y hongos, siendo sintetizados por una o más péptido sintasas no ribosomal (NRPS) (Ayuso-Sacido & Genilloud, 2004). Los genes de las NRPS se encuentran organizados en operones. La biosíntesis de péptidos no ribosomales comparte características con la biosíntesis de policétidos y ácidos grasos; la misma se divide en tres grandes módulos: iniciación, elongación y terminación, donde en cada módulo utiliza diferentes dominios. El péptido final obtenido con frecuencia es modificado a través de glicosilación, acilación, halogenación, y/o hidroxilación (Ayuso-Sacido & Genilloud, 2004).

1.8. Patógenos multidrogo-resistentes

Los ambientes hospitalarios presentan un problema serio en salud pública debido a la aparición de cepas resistentes a múltiples antimicrobianos; por otra parte la tasa de descubrimiento de nuevos antibióticos ha disminuido notoriamente (León *et al.*, 2011). La organización mundial de la salud (OMS) (WHO, 2001), estableció que el mal uso de antibióticos y la excesiva prescripción de los mismos han conducido a la resistencia de muchos agentes patógenos. La resistencia antimicrobiana ha emergido como uno de los principales retos en la salud, ya que se presentan los escenarios clínicos necesarios para el desarrollo de patógenos multidrogo-resistentes (MDR). Por lo general se aplican tratamientos con antibióticos de amplio espectro para diferentes casos de infecciones bacterianas, produciendo así un fenómeno de presión y selección natural como factor de supervivencia bacteriana (Cornejo Avendaño & Ramírez Rosales, 2012). Los microorganismos MDR presentan una resistencia adquirida a múltiples clases de antibióticos no relacionados entre sí, debido a su exposición secuencial o adquisición de elementos genéticos mediadores de resistencia (Cornejo Avendaño & Ramírez Rosales, 2012).

En la actualidad, el problema de resistencia antibiótica se complica aún más con la aparición de otras cepas Gram positivas y Gram negativas MDR. La Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas definió a *Enterococcus* sp. resistente a la vancomicina (ERV), *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SAMR), *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa (KPC), *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y bacterias beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), como patógenos de alta prioridad por representar problemas clínicos o de salud pública relevantes y no contar con nuevas drogas en desarrollo para su tratamiento (Labarca & Araos, 2009).

La resistencia a los antibióticos adquirida por las bacterias se pone de manifiesto por la presencia de una serie de elementos genéticos de origen tanto cromosomal, como es el caso de los transposones y los integrones, o como elementos extracromosomales (plásmidos). Éstos últimos se han convertido en la clave para evadir los efectos de los antimicrobianos, ya que codifican una cantidad importante de enzimas que inactivan a uno o varios de estos agentes, y crean verdaderos problemas a la hora de tratar infecciones causadas por bacterias que las portan. Los plásmidos codifican, entre otras enzimas, a las betalactamasas de espectro reducido y las de espectro amplio que inactivan a betalactámicos como penicilinas y cefalosporinas. Por otro lado se encuentran los integrones, elementos genéticos móviles que median la resistencia a los antibióticos y han sido involucrados en la resistencia incipiente que presentan ya algunas bacterias frente a los carbapenemos, considerados entre los antibióticos más importantes hasta ahora desarrollados (Hernández, 2002).

La aparición de resistencia obliga a desarrollar nuevos antibióticos con mayor eficacia y seguridad tanto para la salud humana como para el medio ambiente (León *et al.*, 2011), ya que algunos de los existentes aunque son efectivos, presentan efectos colaterales indeseables. Históricamente la naturaleza ha servido a la humanidad en el desarrollo de los medicamentos, y una vez más se está apuntando a la búsqueda de nuevos compuestos naturales con diferentes mecanismos de acción.

Por lo expuesto, el estudio de nuevos MS con actividad antimicrobiana provenientes de los actinomicetos resulta de gran interés debido a su diversidad química y funcional. Los metabolitos bioactivos de los actinomicetos, en especial los provenientes el género *Streptomyces*, se presentan como una alternativa para resolver las inquietudes planteadas. En la actualidad, los estudios preliminares se llevan a cabo evaluando la capacidad potencial para sintetizar MS bioactivos mediante pruebas de antagonismo y el uso de técnicas moleculares para detectar la presencia de los genes policétido sintetas (PKS) y péptido sintetas no ribosomal (NRPS) en las cepas seleccionadas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

- El objetivo de este trabajo es aislar y seleccionar cepas de actinomicetos terrestres productores de MS activos contra patógenos multidrogo-resistentes.

2.2. Objetivos particulares

- Aislar Actinobacterias de origen terrestre con el propósito de conformar un cepario.
- Determinar la diversidad de Actinobacterias cultivables presente a lo largo de las zonas muestreadas.
- Explorar el potencial de producción de MS con actividad antimicrobiana mediante ensayos en placa y cultivos líquidos.
- Seleccionar e identificar genotípicamente las cepas de actinobacterias productoras de MS bioactivos.
- Evaluar la capacidad de sintetizar MS bioactivos, mediante la detección de la presencia de genes policétido sintasas (PKS) y péptido sintasas no ribosomal (NRPS), utilizando técnicas de biología molecular.

3. Materiales y Métodos

3.1 Origen de las muestras

Las muestras de suelo se obtuvieron de distintas localidades, tanto nacionales como internacionales (Argentina, Perú, Brasil y Estados Unidos). Las muestras se tomaron mediante la inserción de un corer de polivinilo en el suelo, a una profundidad entre 2-8 cm, luego se colocaron en bolsas de polietileno estéril y se conservaron hasta su procesamiento.

3.2 Aislamiento de los actinomicetos terrestres

El aislamiento de las cepas de actinomicetos se realizó a partir de un gramo de muestra de suelo, que se colocó en 9 ml de agua estéril (dilución 10^{-1}) y se homogenizó mediante vortex. Posteriormente a las diluciones de las distintas muestras se las sometió a dos tipos de pre-tratamiento: uno físico donde se utilizó un baño térmico a 70 °C durante 15 min con el fin de eliminar otros tipos de bacterias y hongos presentes en la muestra; y un pre-tratamiento químico en el cual se empleó fenol al 1,5 % durante 2 h con el efecto de inhibir el crecimiento de géneros bacterianos irrelevantes y estimular la germinación de esporas de otros géneros de actinomicetos (Bredholt *et al.*, 2008). Luego de los pre-tratamientos, se realizaron diluciones seriadas hasta obtener una dilución final 1×10^{-3} g/ml de muestra.

Cada dilución obtenida se homogenizó mediante vortex durante un minuto y una alícuota de 100 µl se sembró en las placas con el medio de cultivo pertinente. Los medios cultivos que se utilizaron para el aislamiento fueron: Agar Caseína Almidón (ACA) (León *et al.*, 2007), Agar Extracto de Levadura (EL) (Espinosa, 2011) y Agar Sintético de Gause's (SG) (Dong-sheng *et al.*, 2014). Todos los medios se suplementaron con cicloheximide (10 µg/ml), nistatina (20 µg/ml) y ácido nalidíxico (40 µg/ml), como agentes inhibidores de hongos y de bacterias Gram negativas. Los medios de cultivos se esterilizaron previamente en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. La composición de los medios se encuentra en Anexo I.

Las placas se incubaron en posición invertida a 28 °C durante 7 - 30 días (Jiménez, 2011). Una vez observado crecimiento, se seleccionaron las colonias con características macro y microscópicas propias de los actinos y se repicaron hasta su purificación definitiva. Las condiciones de incubación se respetaron durante todo el proceso de aislamiento y purificación.

3.3 Caracterización morfológica de los actinomicetos aislados

3.3.1. Caracterización Macroscópica

Como identificación preliminar, durante el tiempo de incubación se observaron las características del crecimiento a nivel macroscópico de cada uno de los actinomicetos aislados. Con este propósito se discriminó la textura, forma, el color tanto del micelio aéreo como el de sustrato y la producción de pigmentos difusibles al medio de cultivo.

3.3.2. Caracterización Microscópica

Se procedió a una caracterización microscópica de los actinomicetos aislados, mediante las tinciones de Gram y azul de metileno, utilizando un microscopio óptico. Los montajes con morfología de interés se fotografiaron. La tinción de Gram se realizó según el protocolo descrito por Prescott (2004).

Luego se realizaron microcultivos con los actinomicetos seleccionados, para tal fin se prepararon placas con 30 ml de medio ACA suplementado con ácido nalidíxico (40 µg/ml) y cicloheximide (10 µg/ml) para inhibir contaminación. Una vez solidificado el medio de cultivo, se utilizó un bisturí para cortar en bloques de 1,5 x 1,5 cm aproximadamente. Se colocaron dos bloques de agar sobre un porta objeto dentro de una placa de Petri (una placa de Petri por microcultivo), posteriormente se realizó una siembra profunda en los laterales de cada bloque y se situó encima un cubre objeto; luego en el interior de la placa de Petri se introdujo un trozo de algodón húmedo y la misma se tapó, funcionando como cámara húmeda. Las placas se llevaron a la estufa a 28 °C durante 10 días. Todo el material se esterilizó con anterioridad en autoclave a 121 °C durante 15 minutos y el montaje se preparó con pinzas estériles.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se observaron al microscopio los cubreobjetos sobre una gota de azul de metileno depositada en una lámina portaobjetos. Para conservar las láminas se sellaron los bordes de los cubreobjetos con esmalte de uñas transparente.

3.4. Conservación

Para la conservación de las cepas anteriormente aisladas se realizó individualmente una siembra en un frasco de vial con ACA o EL, suplementados con glicerol al 1%. Luego de la siembra se colocaron los tapones de algodón hasta que las colonias mostraron señales de esporulación, a

continuación se taparon correctamente. Todo se llevó a cabo en condiciones de esterilidad. Los viales se etiquetaron y almacenaron a temperatura de refrigeración (Jiménez, 2011).

3.5. Cepas indicadoras

Se utilizaron como cepas indicadoras de la actividad antimicrobiana de los actinomicetos aislados, *Enterococcus* resistentes a vancomicina (ERV) (fenotipos van A y van B), *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SAMR), *Listeria monocytogenes* ATCC7644 (LM), *Cronobacter sakazakii* (CS) obtenida de muestra de alimento, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa tipo A (KPC), *K. pneumoniae* (BLEE), y *Pseudomona aeruginosa* carbapenemasa tipo B (metalo carbapenemasa) (PAC), estas últimas se obtuvieron a partir de muestras clínicas. Todas estas cepas son patógenas, y están caracterizadas como bacterias MDR con excepción de *Cronobacter sakazakii*.

Las cepas indicadoras se mantuvieron a través de subcultivos en caldo tripticasa soya (TS) y se conservaron a -20 °C en ceparios con el mismo medio de cultivo al cual se le adicionó glicerol al 15 % v/v. Luego, para su repique en placa se utilizó el agar TS o agar Levine EMB para patógenos Gram positivos y negativos respectivamente.

3.6. Determinación de la actividad antibacteriana

La determinación de la actividad antimicrobiana se realizó a través del método de “doble capa” (Westerdahl *et al.*, 1991), modificado por León & García-Tello (1998). Los actinomicetos se sembraron como macro-colonias en medio ACA a pH 7,6 y se incubaron durante 5 días a 28 °C. Para las pruebas de antagonismo, las cepas estándares previamente se reactivaron en caldo TS y se ajustaron a 10⁶ UFC/ml según la escala 0,5 de Mc Farland. Las pruebas de antagonismo se realizaron mediante la inoculación de las cepas indicadoras en medio semisólido (0,8 % agar) a modo de “segunda capa” sobre los cultivos de los actinomicetos terrestres. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h, realizándose luego las lecturas correspondientes mediante la medida del diámetro de los halos de inhibición.

Se realizó una selección de los actinomicetos aislados del suelo a través de la actividad antimicrobiana frente a ERV y SAMR; posteriormente a estas cepas seleccionadas se les determinó su actividad antagonista frente al resto de las cepas patógenas mencionadas anteriormente.

3.7. Caldo de fermentación y prueba de su actividad inhibitoria

Luego de la selección de las cepas de actinomicetos activos contra patógenos se evaluó la producción de metabolitos bioactivos en medio líquido. Para obtener el caldo de fermentación y determinar la actividad antibacteriana se utilizaron tres medios de cultivo para su producción: caldo de fermentación con hidratos de carbono (CFHC), caldo de fermentación sin hidratos de carbono (CF) y el ISP 1 (International Streptomyces Project) modificado, bajo las condiciones de incubación propuestas por León y col. (2011). Los caldos para producción utilizados se describen en Anexo II.

Las cepas de actinomicetos se reactivaron en tubos de ensayo con 3 ml de caldo TS, se incubaron a 28 °C durante 3 días, luego se homogenizaron mediante vortex y el contenido se adicionó a los frascos Schott con 50 ml del caldo de cultivo pertinente. Una vez sembrados los inóculos se incubaron en constante agitación (150 rpm) a 28 °C durante siete días. Posteriormente los cultivos se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 minutos, con el propósito de obtener sobrenadantes libres de células (SLC) que se conservaron a -20 °C hasta su utilización. Los ensayos de actividad inhibitoria con los SLC se realizaron mediante la técnica de los pocillos según lo recomendado por León y col.(2007). Para tal fin, se sembraron 50 µl de los SLC en pocillos de 6 mm de diámetro dispuestos en placas de Petri con TS previamente inoculados con las cepas estándares (10^6 UFC/ml). Las placas se mantuvieron a 4-8 °C durante 2 h y luego se incubaron a 37 °C durante 24 h. El efecto antimicrobiano se expresó en mm, midiendo el halo de inhibición de crecimiento con un micrómetro (Starrett, USA). Todo el material utilizado se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

3.8. Título de la actividad antimicrobiana

Se realizaron diluciones al medio con los sobrenadantes de las cepas que exhibieron actividad antimicrobiana utilizando agua estéril. Posteriormente se determinó por duplicado la actividad inhibitoria mediante la prueba de difusión en placa. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias/ml. Las unidades arbitrarias (UA) equivalen a la inversa de la mayor dilución con actividad antimicrobiana (halo de inhibición), dividido por los mililitros de sobrenadante sembrados ($UA=1/dilución/ml$ sembrados).

3.9. Extracción de ADN

Las cepas seleccionadas según su actividad antimicrobiana se sembraron en tubos de ensayos con 3 ml de caldo TS y se incubaron a 28 °C durante 3-5 días. La pureza de los caldos se examinó por medio de la coloración de Gram.

Las células bacterianas de cada cepa se procesaron utilizando un equipo comercial de purificación Wizard Genomics Promega (Madison, Wisconsin, EE.UU), según el protocolo detallado a continuación:

1. Los tubos de ensayo se centrifugaron a 4.000 rpm durante 15 minutos, posteriormente se eliminó el sobrenadante.
2. Cada pellet obtenido se resuspendió en una solución de EDTA y lisozima (1 mg/ml), se homogenizó utilizando el vortex y luego se incubó durante 15 minutos a 37 °C.
3. Los tubos de ensayo se centrifugaron a 4.000 rpm durante 15 minutos y se eliminó el sobrenadante.
4. Se agregó a cada tubo una solución de lisis nucleica (TE) y SDS (20 %), los homogenatos obtenidos se sometieron a un baño térmico a 80 °C durante 5-10 minutos, donde se mezclaron manualmente.
5. Los tubos de ensayo se dejaron enfriar y luego se agregó la solución de ARNasa. Se incubaron a 37 °C durante 30 minutos.
6. Las muestras se pasaron a tubos eppendorf previamente rotulados. Posteriormente se les agregó la solución de precipitación de proteínas, se agitaron mediante el vortex y se incubaron en hielo durante 5 minutos.
7. Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 12000g. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos limpios que contenían isopropanol a temperatura ambiente.
8. Luego se centrifugaron igual que en el paso anterior, se descartaron los sobrenadantes, se les agregó etanol (70%) a temperatura ambiente y se realizó una mezcla manual.
9. Las muestras se centrifugaron ídem al paso 7, se eliminó el sobrenadante y el resto de alcohol se dejó evaporar durante 24 horas a 4 °C. Luego, para su posterior utilización se hidrató con solución de hidratación de ADN.

Posteriormente se realizó electroforesis en gel de agarosa para observar y cuantificar las muestras de ADN extraídas. Para tal fin, se preparó un gel de agarosa al 1% m/v en buffer TAE (Tris, ácido acético, EDTA a pH 8), la electroforesis se llevó a cabo en una cubeta horizontal a 70 V. En los pocillos del gel se sembraron 4µl de cada muestra, más 1µl de buffer de carga. Luego de finalizada la corrida, el gel se colocó durante 20 min en una solución de buffer TAE y bromuro de etidio (0,5 µg/ml); posteriormente se observó el gel con luz UV en un transiluminador.

3.10. Identificación genotípica

3.10.1 Amplificación por PCR

El ADN de cada una de las cepas de actinomicetos se utilizó como molde para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen que codifica el ARNr 16S. Para ello se emplearon los cebadores universales para procariotas 27F y 1492R, cuyas secuencias se especifican en la (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencias de los cebadores universales 27F/1492R.

27F	5`-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3`
1492R	5`-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3`

La mezcla de reacción se hizo en un volumen final de 50 µl (Tabla 3). La PCR se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler® (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), el protocolo utilizado se especifica en la Tabla 4. Los productos de amplificación se examinaron en un gel de agarosa al 1,5%, siguiendo las mismas indicaciones de la técnica mencionadas en el punto anterior. Posteriormente los productos de la amplificación de ARNr 16S se enviaron para su secuenciamiento a Macrogen Inc, Corea, donde se utilizó un secuenciador automático.

Tabla 3. Concentración de los reactivos para la amplificación del gen ARNr 16S.

Mezcla de reacción para 50µl	Volumen (µl)
Mezcla madre (5x)	10
Primer F (10 µM)	2

Primer R (10 μ M)	2
Taq (5 μ / μ l)	0,5
Cl ₂ Mg (25 mM)	2
ADN	1
AD (CSP)	50

Tabla 4. Protocolo para la amplificación del gen ARNr 16S.

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo
1-Desnaturalización inicial	94	5´
2-Desnaturalización	94	1´
3-Alineamiento	55	20´´
4-Extención	72	5´
5-Volver al paso 2 por 35 veces		
6-Enfriamiento de las muestras	22	

3.10.2. Análisis de las secuencias del ADNr 16S

Luego de recibir los cromatogramas, estos se analizaron y editaron utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor, se corrigieron los errores en la asignación de bases debido a ruido de fondo en el cromatograma, se eliminaron los segmentos inicial y final (alrededor de 25 nucleótidos de longitud) de cada secuencia parcial debido a que suelen presentar una baja fiabilidad. Las secuencias del ADNr 16S se ensamblaron manualmente, a partir de la combinación de fragmentos separados generados con los iniciadores 27F y 1492R que amplifican el segmento 16S en sentidos opuestos. Las secuencias parcialmente alineadas se unieron para generar una secuencia completa del gen ARNr 16S.

La identificación de las secuencias se determinó mediante la herramienta SeqMatch de la base de datos Ribosomal Database Project (RDP) (Cole *et al.*, 2005), específica para el ARN ribosomal, que contrasta las secuencias buscada con las depositadas en la base y permite obtener su clasificación taxonómica. El grado de similitud entre cada secuencia buscada y las coincidencias encontradas viene indicado por el parámetro S_ab score, definido como el número de heptámeros compartidos entre dos secuencias, dividido entre el número más bajo de oligos únicos en las secuencias. Este parámetro puede diferir de la similitud de secuencia si se compara base a base, pero se calcula que en el 95 % de los casos las 20 coincidencias mostradas son las que presentan mayor identidad de secuencia, ya sea basándose en el S_ab score o en el porcentaje de similitud (Izquierdo Altarejos, 2015).

3.11. Análisis filogenético

A partir de las secuencias se obtienen los árboles filogenéticos de cada género, para así poder caracterizar mejor cada especie encontrada. Como se ha comentado anteriormente, lo que nos aporta la herramienta SeqMatch es la posible identidad, con un alto porcentaje de validez de cada cepa secuenciada.

Para construir los árboles filogenéticos se utilizó el programa de alineamiento múltiple Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). Previamente se seleccionaron las especies válidas de cada género y se obtuvo la secuencia del ADNr 16S de cada especie en el banco de datos RDP; luego se escogió una especie alejada de ellas que sirviera como raíz para así poder dar validez al árbol filogenético. Luego se procedió a generar los árboles filogenéticos mediante el programa MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013), se utilizó el algoritmo Neighbor-Joining (vecino más cercano) con 1000 réplicas, utilizando un segmento de 1300 pares bases. El soporte de cada nodo se analizó con la técnica de “bootstrap” (Felsenstein, 1985).

3.12. Detección de genes de metabolitos secundarios

Los cebadores y protocolos que se utilizaron en PCR para la amplificación de los genes PKS I y NRPS son los descritos por (Ayuso-Sacido & Genilloud, 2004); mientras que en el caso de PKS II se tomaron como referencia el trabajo de Ketela y col. (1999). Los cebadores utilizados se indican a continuación (Tabla 5).

Tabla 5. Cebadores empleados para la reacción de PCR.

Cebador	Tamaño	Secuencia	Referencia
NRPS	700-800 pb	A3F 5'-GCSTACSYSATSTACACSTCSGG-3'	Ayuso-Sacido & Genilloud, 2004
		A7R 5'-SASGTCVCCSGTSCGGTAS-3'	
PKS-I	1200-1400 pb	K1F 5' TSAAGTCSAACATCGGBCA-3'	Ayuso-Sacido & Genilloud, 2004
		M6R 5'CGCAGGTTSCSGTACCAGTA -3'	
PKS-II	618 pb	IIPF6 5'-TSGCSTGCTTCGAYGCSATC-3'	Ketela et al., 1999
		IIPR6 5'-TGGAANCCGCCGAABCCGCT-3'	

4. Resultados

4.1. Origen de las muestras

Las muestras de suelo se obtuvieron de diferentes localidades, el mayor porcentaje corresponde a la Argentina (76%) recolectadas en las provincias de Misiones, La Rioja, Mendoza, Rio Negro y Chubut. El menor porcentaje de las muestras pertenece a los países de Perú, Brasil y Estados Unidos (Figura 4).

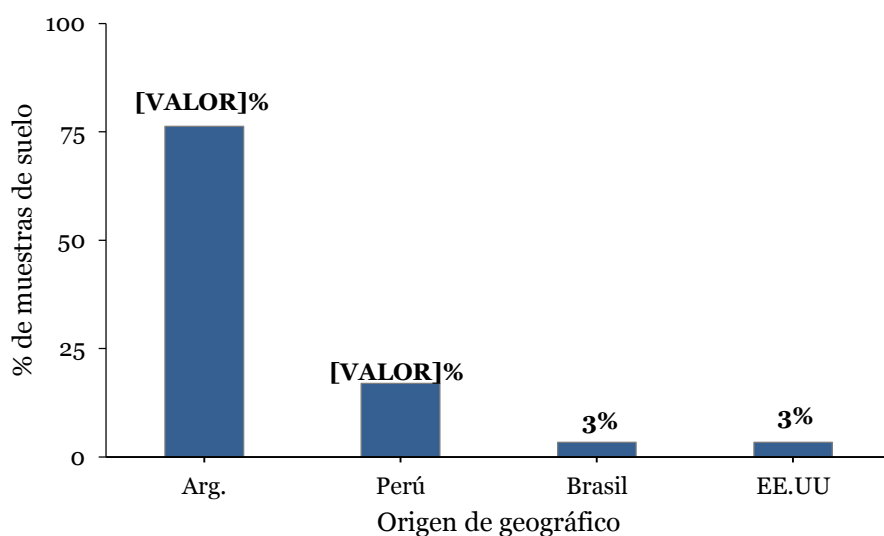


Figura 4. Porcentaje de las muestras de suelo en relación a su origen geográfico.

4.2 Aislamiento de los actinomicetos terrestres

Las diferentes diluciones de las muestras de suelos se sembraron en tres medios de cultivos diferentes (Anexo I). El ACA se emplea como medio no selectivo de actinobacterias (Pinto *et al.*, 2010; Zucchi *et al.*, 2011), el agar EL que corresponde a un medio estándar para el aislamiento y caracterización de *Streptomyces* (Shirling & Gottlieb, 1996) y por el último el SG recomendado como medio oligotrófico (Dong-she ng *et al.*, 2014) para el aislamiento de actinomicetos bioactivos. De esta manera, se lograron aislar 234 colonias, presumiblemente diferentes, con características de actinomicetos.

4.3. Caracterización morfológica de los actinomicetos aislados

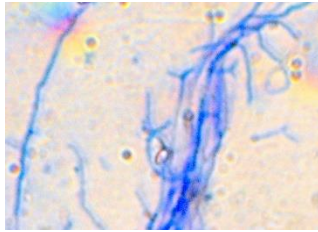
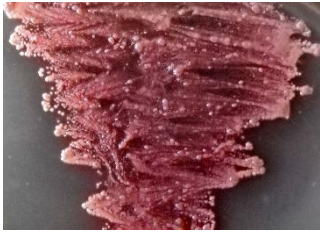
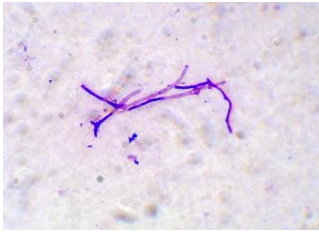
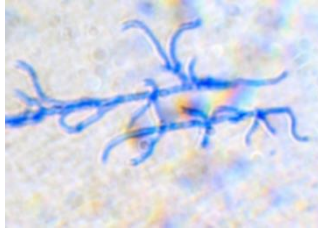

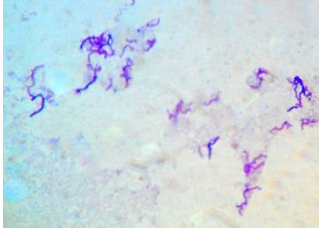



Pasado el tiempo de incubación, las colonias presuntivas de actinomicetos se identificaron teniendo en cuenta las características microscópicas y macroscópicas que las diferencian de las

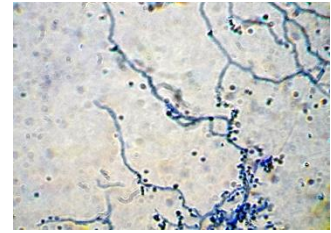
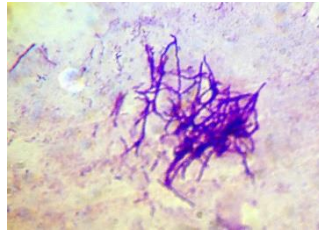
bacterias no filamentosas y los hongos. Mediante microscopía se confirmó que el total de los actinomicetos aislados fueron Gram positivos, presentaron filamentos delgados, ramificados, de tamaño variable y algunos fragmentados en unidades más pequeñas.

Además de la caracterización microscópica de los 234 aislados de actinomicetos, se realizó la evaluación macroscópica teniendo en cuenta la textura de las colonias, coloración del micelio aéreo y de sustrato, la forma, el tamaño y/o la producción de pigmentos difusibles en el medio de cultivo. Las colonias presentaron un olor a suelo húmedo, característica representativa de este grupo microbiano debido a la producción de geosmina (Correa, 2008; Coyne, 2000).

A continuación se describe detalladamente la caracterización macroscópica y microscópica de la selección de actinomicetos que presentaron actividad antimicrobiana frente a las cepas de ERV y SAMR (Tabla 6).

Tabla 6. Descripción macro y microscópica (Coloración de Gram y Microcultivo) de las cepas de actinomicetos seleccionadas. Imágenes microscópicas con aumento 1000X.

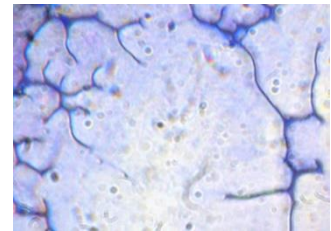
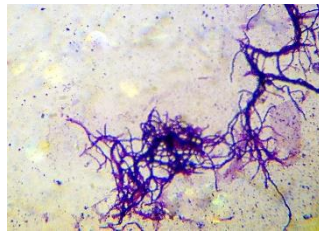
Cepa	Características Macroscópicas	Características Microscópicas	
		Tinción de Gram	Microcultivo
AC1B	Colonia de aspecto cremosa, color del micelio aéreo y sustrato rojizo.	Micelio vegetativo sin fragmentación, cadenas de conidias sencillas.	
			
AC12B	Colonia polvorienta, con pigmentación, color del micelio aéreo y sustrato amarillento.	Hifas cortas y ramificadas; micelio aéreo con aspecto ondulante.	
			
AC21B	Colonia pequeña y polvorienta, color del micelio aéreo y sustrato blanco.	Hifas simples y ramificadas, las cuales forman una red extensa.	
			
AC45C	Colonias pequeñas, color del micelio aéreo naranja amarronado y micelio de sustrato gris verdoso.	Hifas con aspecto tortuoso, no fragmentadas; se observa la presencia de esporas en el microcultivo.	



Colonia pequeña y polvorienta, color del micelio aéreo y micelio de sustrato blanco.

Hifas simples, no fragmentadas; se puede observar extremos bifurcados.

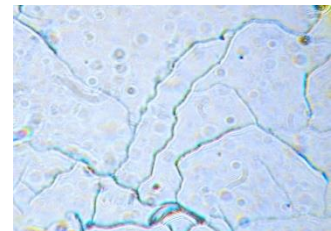
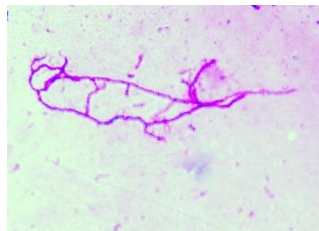
AC47A



Colonia grande, color del micelio aéreo blanco brillante y micelio de sustrato beige.

Hifas tortuosas, delgadas largas y ramificadas.

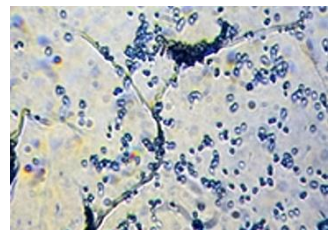
L60A



Colonia polvorienta, color del micelio aéreo y de sustrato gris.

Hifas simples largas, no tortuosas y ramificadas, presencia de esporas.

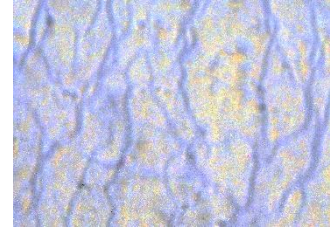
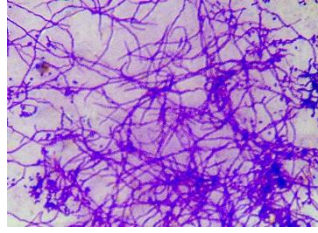
L67A



L67G

Colonia pequeña polvorienta, color del micelio aéreo y de sustrato blanco.

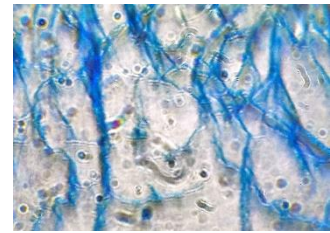
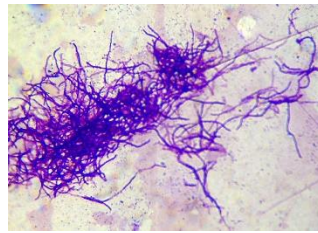
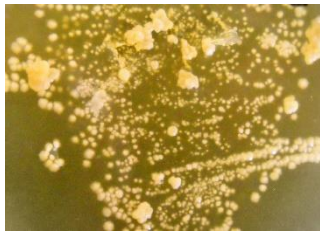
Hifas largas, tortuosas, ramificadas, no fragmentadas; las cuales forman una red extensa.



Colonia con pigmentación, color del micelio aéreo y de sustrato amarillo intenso.

Hifas tortuosas ramificadas, las cuales forman una red definida.

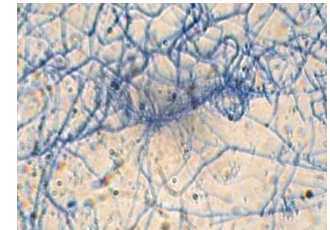
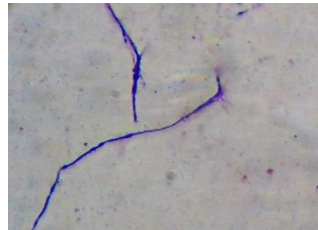
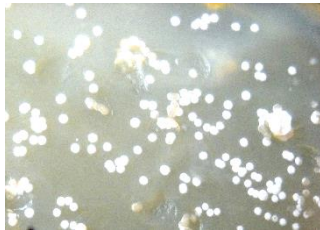
AC69C



Colonia polvorienta, color del micelio aéreo y de sustrato blanco.

Hifas largas onduladas y ramificadas; las cuales se disponen en una red densa.

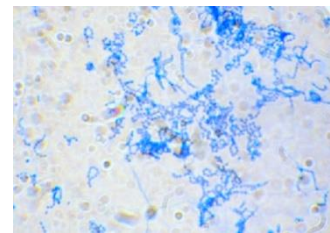
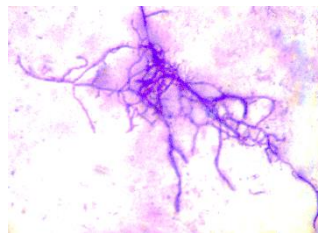
L73M



Colonia polvorienta, color del micelio aéreo blanco y del micelio de sustrato verde oscuro.

Micelio vegetativo no fragmentado, micelio aéreo fragmentado presentando cadenas de conidios largos en espiral.

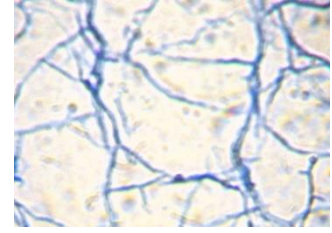
ACF82B



ACF82D

Colonia polvorienta, color del micelio aéreo blanco y del micelio de sustrato amarillo verdoso.

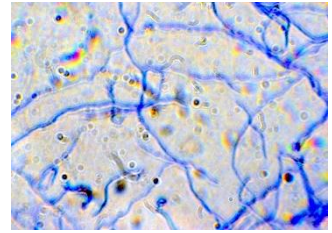
Hifas tortuosas, ramificadas, no fragmentadas. Presencia de hifas dispuestas en una red extensa.



Colonia aspecto cremosa,
micelio aéreo y de sustrato
beige.

Hifas tortuosas, ramificadas, no fragmentadas. Presencia de
hifas dispuestas en una red extensa.

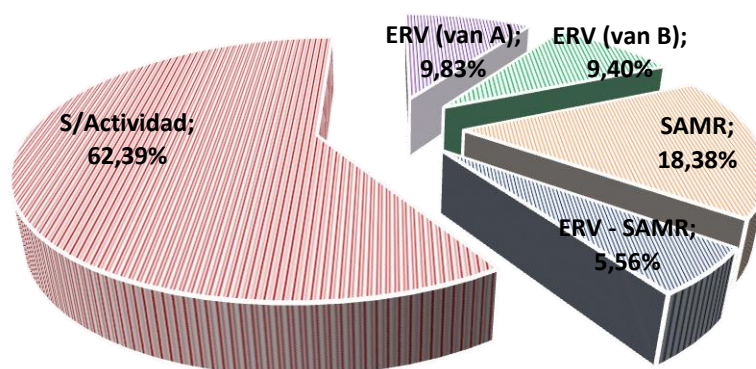
AC87D



4.4. Determinación de la actividad antibacteriana

Se realizó a las 234 cepas aisladas, la prueba de la doble capa antimicrobiana frente a las cepas patógenas ERV (van A y van B) y SAMR. Se puede observar en la figura 5 que el 18,4% de las cepas mostraron actividad antagonista frente a SAMR mientras que, solo el 9,8 y el 9,4 exhibieron antagonismo frente a ERV van A y van B, respectivamente. Del total de cepas, se seleccionaron 13 (5,6%) sobre la base de su actividad frente a los 3 patógenos ensayados con el propósito de realizar pruebas complementarias de antagonismo frente a otros patógenos.

Figura 5. Porcentaje de las cepas con y sin actividad antimicrobiana.



Se pudo determinar que el tamaño de los halos de inhibición varió desde 15 hasta más de 20 mm de diámetro (Figura 6). La cepa AC69C exhibió halos de inhibición de mayor diámetro en comparación con el resto de los actinomicetos.

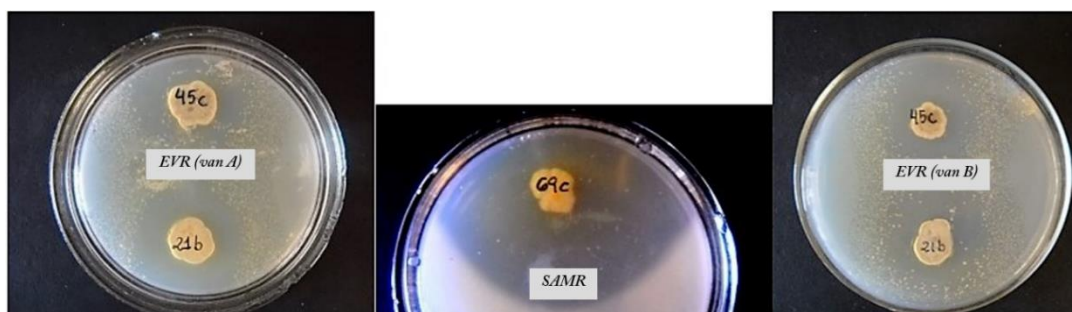


Figura 6. Actividad inhibitoria frente a tres de las cepas testigos MDR; EVR (van A y van B) y SAMR.

Luego de la selección de actinomicetos sobre la base de la actividad inhibitoria contra cepas MDR Gram positivas se determinó su actividad frente al resto de las cepas patógenas mencionadas anteriormente. Se observó que la cepa AC21B presentó inhibición frente a todos los patógenos analizados, salvo contra *P. aeruginosa*, mientras que las cepas AC45C-L67A y AC1B- L60A-AC69C presentaron actividad inhibitoria frente a las mismas indicadoras, pero con diferente intensidad (distinto diámetro de halo) (Tabla 7).

Tabla 7. Selección de cepas actinomicetos con actividad antimicrobiana frente a bacterias MDR.

Cepas	ERV (A)	ERV (B)	SARM	BLEE	KPC	CS	LM	PAC
AC1B	+++	+++	+++	-	-	-	++	-
AC12B	++	++	+	-	-	-	-	-
AC21B	+++	+++	+++	+++	+++	(d)+	+++	-
AC45C	++	++	++	++	++	-	+++	-
AC47A	++	++	++	-	-	-	-	-
L60A	+	+	+	-	-	-	+	-
L67A	+	+	+++	+	(d)+	-	++	-
L67G	++	++	+	-	-	-	-	-
AC69C	+++	+++	+++	-	-	-	+++	-
L73M	++	++	++	-	-	-	++	-
ACF82B	+++	+++	+++	-	-	-	+	-
ACF82D	++	++	++	-	-	-	+	-
AC87D	++	++	++	-	-	-	+	-

*ERV (van A, van B): Enterococcus resistentes a vancomicina; SARM: *Staphylococcus aureus* metilino resistente; BLEE: *Klebsiella pneumoniae* b-lactamasas de espectro extendido; KPC: *K. pneumoniae* carbapenemasa tipo A; CS: *Cronobacter sakazakii*; LM: *Listeria monocytogenes* (ATCC7644); PAC: *Pseudomona aeruginosa* carbapenemasa tipo B. (+++: halo \geq 20 mm; ++: halo entre 15 a 20 mm; +: halo \leq 15 mm. d: difuso).

4.5. Caldo de fermentación y prueba de su actividad inhibitoria

Este ensayo se realizó con la selección de cepas de actinomicetos, donde se evaluó la producción de metabolitos bioactivos en diferentes medios líquidos. Únicamente los sobrenadantes de la cepa AC69C mostraron actividad antagónica frente a los patógenos Gram positivos evaluados.

4.6. Título de la actividad antimicrobiana

La actividad inhibitoria se determinó por duplicado mediante la prueba de difusión en placa. Se evaluaron los sobrenadantes de la cepa AC69C, derivados de los distintos caldos de fermentación, frente a las cepas indicadoras Gram positivas (Tabla 8).

Tabla 8. Actividad inhibitoria mediante la prueba de difusión en placa.

Cepas Indicadoras	Unidades Arbitrarias (UA)/ml		
	CFHC	CF	ISP 1
ERV (van A)	640	320	40
ERV (van B)	320	320	40
SARM	80	40	0
LM	320	80	0

*CFHC: Caldo de fermentación con hidratos de carbono; CF: Caldo de fermentación sin hidratos de carbono; ISP 1 (International Streptomyces Project).

4.7. Identificación genotípica

Luego de la extracción del ADN de las cepas seleccionadas de actinomicetos se procedió a realizar la identificación molecular de las mismas por medio de la amplificación del gen codificante del ARNr 16S, empleando los cebadores universales 27F y 1492R. Mediante electroforesis en gel de agarosa se detectaron los fragmentos amplificados obtenidos tras la PCR, presentaron un tamaño esperado de 1500 pares de bases.

4.7.1 Análisis de las secuencias del ADNr 16S

Luego de trabajar con los cromatogramas, se logró identificar las secuencias del ADNr 16S a nivel de especie con su respectivo porcentaje de identidad. La mayoría de las cepas presentaron un alto porcentaje de identidad con el género *Streptomyces*, salvo la cepa L73M que mostró un elevado porcentaje de identidad con el género *Actinomadura* (Tabla 9).

Estos resultados se corroboraron mediante un análisis filogenético, donde se alinearon las secuencias completas y/o parciales del ADNr 16S válidas para cada género obtenidas de la base

de datos RDP. Los nombres de las cepas y los números de acceso de la base de datos se especifican en el Anexo III.

Tabla 9. Resultados del análisis BLASTN de las secuencias de ADNr 16S de la selección de cepas de actinomicetos.

Cepas	Especies relacionadas	Identidad (%)
AC1B	<i>S. collinus</i>	99,4
AC12B	<i>S. lienomycini</i>	99
AC21B	<i>S. flavoviridis, S. pilosus</i>	100
AC45C	<i>S. labedae, S. variabilis, S. griseoincarnatus, S. erythrogriseus, S. griseorubens</i>	98,5
AC47A	<i>S. antimycoticus, S. sporoclivatus</i>	98
L60A	<i>S. phaeochromogenes, S. umbrinus, S. aurantiacus, S. glomeroaurantiacus</i>	93,6
L67A	<i>S. griseoincarnatus, S. erythrogriseus, S. griseorubens, S. labedae, S. variabilis</i>	98,8
L67G	<i>S. rochei</i>	100
AC69C	<i>S. antibioticus</i>	100
L73M	<i>Actinomadura cremea</i> <i>A. glauciflava</i> <i>A. sediminis</i>	98,5 92,9 92,5
ACF82B	<i>S. flavovariabilis</i>	96,6
ACF82D	<i>S. microflavus</i>	100
AC87D	<i>S. bottropensis</i>	97,6

4.8. Análisis filogenético

Mediante el programa Clustal W se realizó el alineamiento múltiple entre las secuencias de las cepas de estudio y las secuencias de las especies validadas del género, para lograr alcanzar la máxima similitud entre ellas. Se eligió como out-group o raíz la secuencia del ADNr 16S de *Bacillus subtilis*, debido a que es una bacteria coreniforma próxima a los aislados estudiados pero lo suficientemente alejada como para dar validez al árbol filogenético. A través del programa MEGA 6.06 se obtuvo un árbol consenso que muestra las relaciones filogenéticas de las 13 cepas seleccionadas de actinomicetos con las secuencias validadas para cada género,

Streptomyces y *Actinomadura*. El árbol filogenético presentó valores de “bootstrap” ≥ 60 en los nudos terminales y una escala de 0,02 que indica las sustituciones por posición de nucleótido (Figura 7).

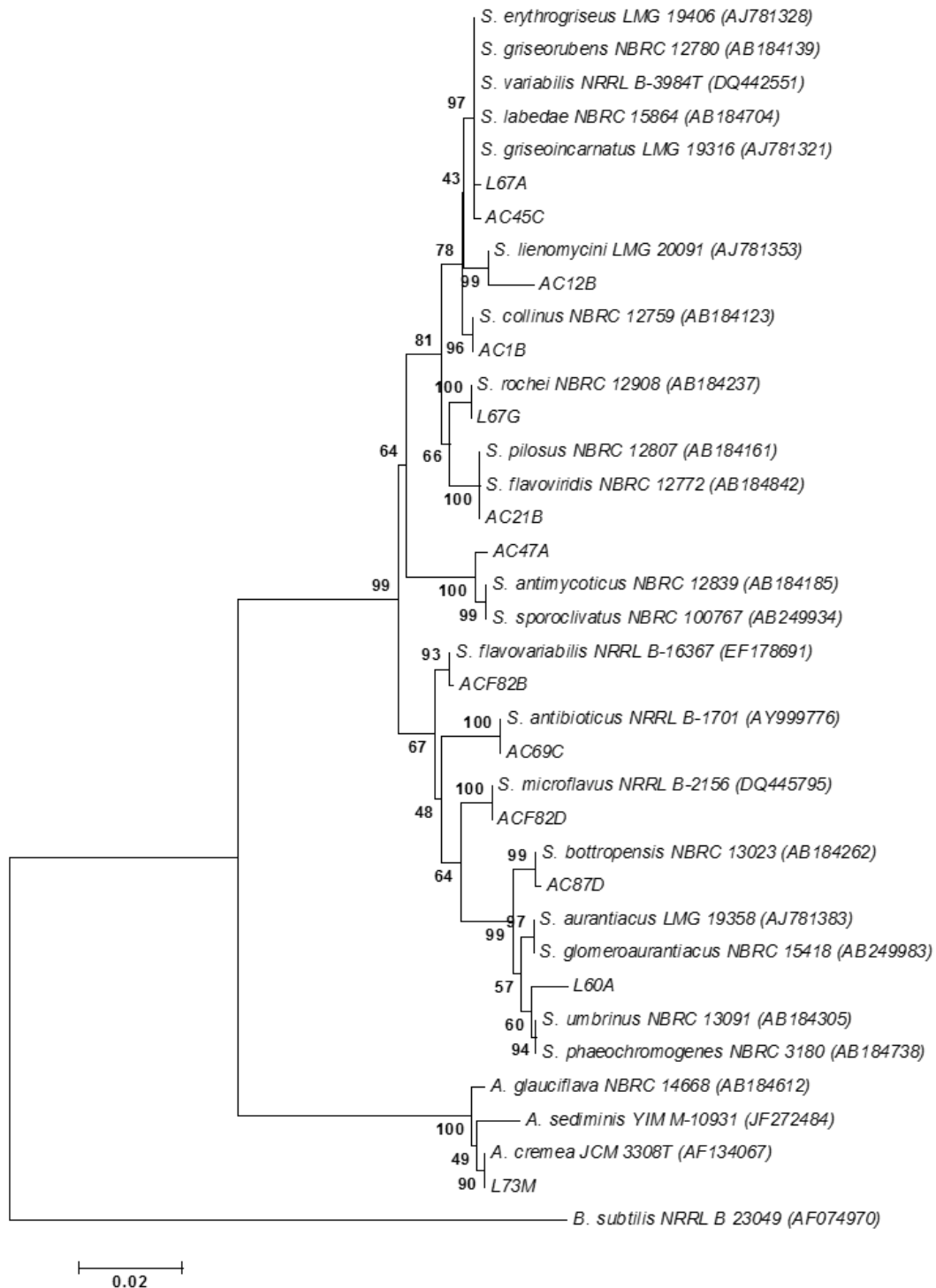


Figura 7. Árbol filogenético parcial basado en la comparación de secuencias del ADNr 16S entre los aislados obtenidos y las especies validadas para cada género.

*Los porcentajes en los nudos indican los niveles de “bootstrap” significativos basados en 1000 réplicas. Escala: 0.02 sustituciones por posición de nucleótido. El número de acceso se muestra entre paréntesis.

Se puede observar que las cepas AC45C y L67A están emparentadas con las mismas especies *S. labedae*, *S. variabilis*, *S. griseoincarnatus*, *S. erythrogriseus* y *S. griseorubens*. Luego para cada una de las siguientes relaciones: AC12B-*S. lienomycini*, AC1B-*S. collinus*, L67G-*S. rochei*, AC69C-*S. antibioticus*, ACF82B-*S. flavovariabilis*, ACF82D-*S. microflavus*, y AC87D-*S. bottropensis*, se identifica un único cluster con valores de bootstrap significativo (>70). Por último la cepa L60A mostró un parentesco más cercano con *S. phaeochromogenes* y *S. umbrinus*; y el aislado L73M se encuentra filogenéticamente próximo a la especie *Actinoadura cremea*, mostrando un valor de bootstrap significativo (>70). Estas trece secuencias de los actinomicetos identificados filogenéticamente, ya sea a nivel de género o especie, se subieron a la base de datos de NCBI; presentando un número provisorio para cada una de las secuencias (Anexo IV).

4.9. Detección de genes de metabolitos secundarios

Se evaluó la presencia de los genes PKS I, PKS II y NRPS en las cepas de actinomicetos seleccionadas. Al revelar los resultados de electroforesis en gel de agarosa se observó que el 30,8 % las cepas mostraron el producto de amplificaron del gen NRPS, mientras que solo el 15,4 % amplificó del gen PKS-I y por último la amplificación fue negativa para PKS-II (Tabla 10).

Tabla 10. Amplificaciones de los genes NRPS, PKASI y PKSII.

Cepas	NRPS	PKSI	PKSII
AC1B	-	-	-
AC12B	-	-	-
AC21B	-	-	-
AC45C	+	-	-
AC47A	-	-	-
L60A	-	-	-
L67A	-	+	-
L67G	+	-	-
AC69C	-	-	-
L73M	-	-	-
ACF82B	+	+	-
ACF82D	+	-	-
AC87D	-	-	-

(+: Amplificación positiva; -: Amplificación negativa).

5. Discusión

Por medio del presente estudio se comprobó que los medios de cultivos utilizados resultaron adecuados para el aislamiento de actinos. Se demostró que el agar EL funcionó para el aislamiento requerido, ya que la mayoría de las cepas aisladas pertenecen al género *Streptomyces*, pero también se pudo obtener una cepa del género *Actinomadura*, no mostrándose específico para el género citado (Soler Hernández, 2012).

El pre-tratamiento con fenol está recomendado para inhibir el desarrollo de estreptomicetos y obtener otros géneros menos frecuentes según Bredtholt y col. (2008) sin embargo, en este trabajo las dos cepas (ACF82B-ACF82D) seleccionadas a partir de esta técnica presentaron similitud con el género *Streptomyces*. Es importante destacar que durante esta investigación las colonias de actinomicetos se exhibieron de manera distinta en los diferentes medios empleados, ya que el desarrollo y morfología de los microorganismos depende de las fuentes de carbono y nitrógeno que componen cada medio de cultivo (Correa, 2008).

Las trece cepas seleccionadas presentaron características macro y microscópicas comunes a las actinobacterias, la mayoría exhibió una consistencia seca e hifas delgadas ramificadas Gram positivas. Sin embargo, cada una de las trece colonias exhibió propiedades únicas, que permitieron distinguirlas entre sí, y por lo tanto se infirió que corresponderían a especies diferentes. La mayoría de las colonias presentaban una tonalidad blanca, seguida de la serie del color gris y verde. En diversos trabajos se reportó la gama blanco a gris como predominante de los aislados de los actinomicetos (Parthasarathi *et al.*, 2012; Saadou & Gharaibeh, 2002).

La selección preliminar por medio de la actividad antimicrobiana de las cepas de actinomicetos terrestres manifiesta que menos de la mitad de los aislados (37,6 %) presentó actividad contra alguno de los tres patógenos utilizados (ERV y SAMR). La selección final (5,6 %) de las cepas de actinomicetos se obtuvo a través de la actividad antimicrobiana frente a las tres cepas patógenas evaluadas. La actividad de los aislamientos depende en su mayoría de los métodos preliminares de selección y los medios de cultivos utilizados (Kouadri *et al.*, 2014). Esto no significa que los medios empleados sean inadecuados o poco selectivos, sino que diferentes cepas de actinomicetos productoras de antimicrobianos específicos requieren distintos tiempos y medios de cultivos para lograr concentraciones detectables (Srivibool & Sukchotiratana, 2006). Las 13 cepas de actinomicetos seleccionadas se evaluaron frente a los restantes patógenos, determinándose que la mayoría de los actinomicetos seleccionados (77 %) inhibieron únicamente a bacterias Gram positiva; y solo 3 cepas (23 %) (AC21B, AC45C y L67A) produjeron sustancias antimicrobianas tanto para bacterias Gram positivas como negativas.

Ninguna de las cepas seleccionadas exhibió actividad antagónica frente al patógeno *P. aeruginosa*. Resultados similares a los obtenidos en este estudio se reportaron para el género *Streptomyces* (Kouadri *et al.*, 2014; Silambarasan *et al.*, 2012; Valli *et al.*, 2012).

La diferencia de actividad antagónica entre bacterias Gram positivas y negativas puede ser debido a la estructura celular, la membrana externa de polisacáridos en Gram negativos actúa como una barrera y la ausencia de la misma en bacterias Gram positivas puede aumentar la susceptibilidad de dicha célula a los antimicrobianos (Silambarasan *et al.*, 2012; Valli *et al.*, 2012). Se presume que un halo de gran actividad antimicrobiana indica más eficacia o mayor difusibilidad de la sustancia o ambos, y la ausencia del halo indica una resistencia completa. Por lo tanto, un halo de diámetro menor no indica que la sustancia no sea lo suficientemente activa o potente sino que no se difundió bien en el medio, debido a la polaridad del compuesto antimicrobiano (Srivibool & Sukchotiratana, 2006).

La producción de metabolitos bioactivos en medio líquido se logró solo para la cepa AC69C (*S. antibioticus*). Se evaluó por medio del título de la actividad inhibitoria la producción en diferentes caldos de fermentación, resultando ser más eficiente el caldo de fermentación con hidratos de carbono, seguido por el caldo de fermentación sin hidratos de carbono y por último el medio ISP 1. En consecuencia, se comprueba que la habilidad de los microorganismos para producir antibióticos no es una característica constante, sino que puede ser incrementada o disminuida, dependiendo de las condiciones de fermentación en las cuales se desarrollan (Kouadri *et al.*, 2014; Uzcátegui Negrón *et al.*, 2013). Estudios anteriores con *S. antibioticus* determinaron que crece utilizando una variedad de fuentes de carbono y nitrógeno (Vilches *et al.*, 1990). La biosíntesis de algunos MS y antibióticos está afectada por la velocidad del consumo de las fuentes citadas; cuando ésta se reduce la producción de MS se produce eficazmente, de lo contrario ocasiona un efecto negativo. (Drew & Demain, 1977).

En el modelo clásico, el ciclo de vida de *Streptomyces* en medio sólido se diferencia en micelio sustrato (vegetativo) y micelio aéreo (reproductivo). Recientemente se ha descrito un nuevo modelo de ciclo de vida basado en estudios moleculares de transcriptómica y proteómica, en el que se describen nuevas fases de diferenciación para el crecimiento en superficie y para cultivos sumergidos (Manteca & Sanchez, 2009; Manteca *et al.*, 2008). En una primera fase se produce la germinación de las esporas como micelio joven compartimentalizado (micelio I), que forma agregados desde tiempos tempranos en el crecimiento y comienza a morir desde el centro del agregado hacia afuera, intercalándose segmentos de micelio viables y muertos, produciéndose finalmente una muerte celular programada (Manteca *et al.*, 2007). Este proceso de muerte supone una pausa en el crecimiento que precede a la formación de micelio multinucleado

(micelio II), que crece a partir de los segmentos viables que quedan del micelio I. Se han definido dos tipos de micelio II sobre la base de la ausencia o presencia de las capas hidrofóbicas de las hifas aéreas, denominados temprano y tardío, respectivamente. El micelio sustrato del modelo clásico se corresponde con el micelio temprano del nuevo modelo y el micelio aéreo con la fase tardía del micelio II, el cual ya se ha recubierto de la superficie hidrofóbica. El micelio II tardío sufre una segunda ronda de muerte, dando lugar a la formación de esporas (Manteca & Sanchez, 2009; Manteca *et al.*, 2008).

En cultivos líquidos, el modelo clásico asume que el micelio sustrato, al alcanzar la fase estacionaria, produce los MS, ya que en estas condiciones es infrecuente la diferenciación morfológica. El nuevo modelo propone la muerte celular programada del micelio I y la generación del micelio II que es el verdadero productor de MS. En este nuevo modelo existe diferenciación morfológica tanto en líquido como en sólido, siendo la diferencia más importante la ausencia de una segunda ronda de muerte celular y esporulación en cultivos sumergidos (Manteca & Sanchez, 2009; Manteca *et al.*, 2008). En consecuencia, parece que un mecanismo programado de muerte celular, equivalente al mecanismo de apoptosis en organismos superiores, es el principal desencadenante de la producción de antibióticos en *Streptomyces* (Manteca *et al.*, 2008; Bibb, 2005). Concretamente, uno de los principales desencadenantes en *S. coelicolor* y otras especies de *Streptomyces* es la acumulación en el medio de N-acetilglucosamina (componente del peptidoglicano de las paredes celulares bacterianas), resultado de la muerte del micelio sustrato (Rigali *et al.*, 2008).

El análisis filogenético determinó que todas las cepas seleccionadas pertenecen al género *Streptomyces*, salvo el aislado L73M, emparentado con el género *Actinomadura*; las cepas AC45C, L67A y L60A no se lograron identificar a nivel de especie como el resto. Esta alta proporción encontrada del género *Streptomyces* en las cepas seleccionadas, se debe a que el mismo representa el 70-95% de los aislamientos de suelo (Sagardoy & Mandolesi, 2004). Ninguna de las cepas de actinomicetos se relacionó filogenéticamente con especies patógenas.

Las investigaciones apuntadas a la detección y ocurrencia de las rutas metabólicas biosintéticas son de gran valor para lograr entender el impacto ecológico de estos microorganismos en la población (Ehrenreich *et al.*, 2005). En este trabajo se utilizaron cebadores degenerados para la detección por PCR de los genes NRPS (700-800 pb), PKS-I (1200-1400 pb) y PKS-II (618 pb) en las 13 cepas seleccionadas de actinomicetos. Los resultados revelaron que los genes NRPS se detectaron en mayor proporción (30,8 %) seguido por PKS-I (15,4 %), pero no se detectó la presencia de los genes PKS-II. Ayuso-Sacido & Genilloud (2004) detectaron entre 79,5% y 56,7% de genes NRPS y PKS-I respectivamente en actinomicetos; mientras que en el caso

específico del género *Streptomyces* los genes NRPS y PKS-I se detectaron con mayor frecuencia (97 % y 79 % respectivamente). En cambio, en cepas de *Streptomyces* aisladas de muestras de suelos tropicales se detectaron genes PKS-I en mayor proporción (72,4 %), con respecto a los NRPS (60,0 %) y PKS-II (69,2 %) (Ayuso *et al.*, 2005). Al analizar los resultados de este trabajo se determina que no existe una relación entre la actividad antimicrobiana y la presencia de los genes (NRPS, PKS-I y PKS-II) de los actinomicetos seleccionados. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para aislados de *Streptomyces* marinos, donde no observaron dicha relación al analizar las amplificaciones de los genes NRPS y PKS-II (Kouadri *et al.*, 2014). En cambio, los resultados difieren a los obtenidos en otras investigaciones, donde comprobaron que el porcentaje de las amplificaciones de NRPS y PKS-I (excepto para PKS-II) resultaron ser al menos dos veces mayor en el grupo de cepas activas comparado con las inactivas (Ayuso *et al.*, 2005).

Los cebadores NRPS y PKS-I amplifican secuencias altamente conservadas de los dominios de adenilación asociados con NRPS y dominios de cetosintasa (KS) asociados con el gen PKS-I (Ayuso-Sacido & Genilloud, 2004). La ausencia de la amplificación de los genes en alguno de los aislados puede indicar su ausencia o que estas secuencias conservadas presentan una mayor variación y por lo tanto los cebadores utilizados no son útiles para amplificar la región en estudio.

El genoma de *Streptomyces* presenta varios grupos de genes NRPS y PKS, esto puede indicar que un importante número de componentes potencialmente bioactivos aún están sin identificar (Kouadri *et al.*, 2014). Por último, para llegar a conocer el efecto bactericida real frente a los patógenos multidrogo-resistentes así como para determinar si se trata de algún compuesto estructuralmente nuevo, sería necesario la purificación de los compuestos activos así como la evaluación de la capacidad sinérgica de los componentes con diferentes solventes (León *et al.*, 2011).

De las trece cepas seleccionadas, es importante destacar a *S. antibioticus* (AC69C) por su mayor actividad antimicrobiana frente a patógenos Gram positivos y por ser la única que produjo metabolitos bioactivos en medio líquido; mientras que *S. flavovariabilis* (AC82B) sólo presentó producción de sustancias antagónicas frente a patógenos Gram positivos en medio sólido y se detectó la presencia de los genes NRPS y PKS-I. Por otra parte, la cepa *S. pilosus* (AC21B) resultó la única con capacidad de inhibir en medio sólido a la mayoría de los patógenos Gram positivos y negativos evaluados, salvo *P. aeruginosa*.

6. Conclusión

De las 234 cepas estudiadas en el presente trabajo, el 8,1 % (19 aislados) presentaron actividad inhibitoria contra ERV (fenotipo van A y van B), mientras que 18,4 % (43 aislados) resultaron activas sólo contra SAMR.

En la actualidad, todas las cepas aisladas en esta tesis forman parte de la colección de microorganismos que dispone el Laboratorio de Biotecnología Bacteriana (Sede Trelew – UNPSJB) y se encuentran disponibles para futuros estudios complementarios.

Si bien en la literatura se recomienda la quimiotaxonomía para poder identificar actinomicetos por fenotipia, la técnica del análisis del ARNr 16S, que incluye la elaboración de árboles filogenéticos y matrices de similitud nucleotídica, ha resultado ser el método más fiable. Sin embargo, las cepas AC45C, L60A y L67A no pudieron identificarse a nivel de especie. Estos resultados se deben a la gran diversidad genética del phylum Actinobacteria, específicamente el género *Streptomyces* comprende en la actualidad más de 500 especies. Los bancos de datos disponibles presentan algunas veces información confusa al respecto debido a que la responsabilidad del ingreso de las secuencias corre por cuenta de cada autor. En cambio, las cepas de referencias (colecciones internacionales) son sometidas a pruebas complementarias y son ingresadas a los bancos de datos una vez confirmada su identificación genotípica definitiva.

Del total de cepas aisladas, se seleccionaron 13 que presentaron inhibición en placa contra los tres patógenos MDR (ERV y SAMR). Al evaluar la producción de metabolitos activos en diferentes medios líquidos, sólo la cepa AC69C (*S. antibioticus*) resultó activa. Esta aparente discrepancia con los resultados en placa podría deberse a que la regulación genética durante la producción de metabolitos secundarios es muy compleja en este grupo bacteriano. La producción de antibióticos depende en gran medida de la presión selectiva del medio ambiente, de las condiciones nutricionales (fuente de C, N, sales minerales, pH, etc) durante la fermentación e influyen en gran medida en la biosíntesis de moléculas bioactivas.

Los cebadores utilizados en este estudio para evaluar la presencia de genes de policétidos sintetasas tipo I (PKS I), policétidos sintetasas tipo II (PKS) II y sintetasas peptídicas no ribosomales (NRPS) están ampliamente recomendados por la literatura consultada. Sin embargo, del total de cepas seleccionadas sólo dos (L67A y ACF82B) amplificaron para PKS I, cuatro cepas (AC45C, L67G, ACF82B y ACF82D) dieron bandas compatibles para los cebadores NRPS, mientras que no se obtuvieron resultados cuando se utilizaron los cebadores PKS II. Si bien nuestros resultados indican que las cepas estudiadas producen metabolitos

bioactivos en medio sólido, la ausencia de amplificación podría deberse al tipo de cebadores utilizados (degenerados) y que los mismos no resultaran los adecuados para amplificar los genes mencionados

Los resultados obtenidos permiten confirmar, no sólo el carácter cosmopolita de los actinomicetos, sino también su capacidad para sintetizar metabolitos con capacidad inhibitoria. Estudios posteriores deberán ser dirigidos para lograr la identificación y purificación de los productos activos de la cepa *S. antibioticus* (AC69C) y las condiciones fisicoquímicas adecuadas que permitan la producción de antimicrobianos en las 12 cepas restantes seleccionadas por su actividad en medio sólido.

También se deberá tener en cuenta que, además de compuestos antimicrobianos, las actinobacterias pueden sintetizar otros productos de interés farmacológico por lo que la colección estudiada en esta tesis puede servir de plataforma de estudio para la búsqueda de otros metabolitos de interés.

7. Divulgación de Resultados

Los resultados parciales obtenidos en el presente trabajo de investigación fueron expuestos a la comunidad científica en la XXVI Reunión Argentina de Ecología RAE 2014 “Ecología y desarrollo: un desafío hacia la sustentabilidad”, trabajo titulado “Actinomicetos productores de metabolitos antagónicos contra enterococos resistentes a vancomicina”; y en las II Jornadas Patagónicas de Ciencias Ambientales, III Jornadas Patagónicas de Biología, V Jornadas Estudiantiles de Ciencias Biológicas, trabajo titulado “Actinomicetos de origen terrestre productores de metabolitos antagónicos contra bacterias multidrogo-resistentes”. Ambos trabajos se expusieron en la modalidad de poster.

7. Bibliografía

- Ayuso, A., Clark, D., Gonzalez, I., Salazar, O., Anderson, A. & Genilloud, O. (2005).** A novel actinomycete strain de-replication approach based on the diversity of polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase biosynthetic pathways. *Appl Microbiol Biotechnol* **67**, 795–806. Germany.
- Ayuso-Sacido, A. & Genilloud, O. (2004).** New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: Detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microb Ecol* **49**, 10–24.
- Baerson, S. R. & Rimando, A. M. (2007).** *Plethora of Polyketides: Structures, Biological Activities and Enzymes. Cap 1-A*, ACS.
- Barreiro, C., Prieto, C., Sola-Landa, A., Solera, E., Martínez-Castro, M. & Pérez-Redondo, R. (2012).** Draft genome of *Streptomyces tsukubaensis* NRRL 18488, the producer of the clinically important immunosuppressant tacrolimus (FK506). *J Bacteriol* **194**, 3756–3757.
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeno-Tarraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R. & James, K. D. (2002).** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**, 141–147.
- Bergey, J. & Hendricks, D. (1974).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (W. & Wilkins, Ed.).
- Bibb, M. J. (2005).** Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr Opin Microbiol* **8**, 208–215.
- Bredholt, H., Fjaervik, E., Johnsen, G. & Zotchev, S. B. (2008).** Actinomycetes from sediments in the Trondheim fjord, Norway: Diversity and biological activity. *Mar Drugs* **6**, 12–24.
- Challis, G. L. & Hopwood, D. A. (2003).** Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc Natl Acad Sci* **100 Suppl 2**, 14555–14561.
- Choulet, F., Aigle, B., Gallois, A., Mangenot, S., Gerbaud, C. & Truong, C. (2006).** Evolution of the terminal regions of the *Streptomyces* linear chromosome. *Mol Biol Evol*

23, 2361–2369.

- Cole, J., Chai, B., Farris, R., Wang, Q., Kulam, S. & Mcgarrell, D. (2005).** The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* **33**, 294–296.
- Cornejo Avendaño, J. R. & Ramírez Rosales, A. (2012).** Resistencia antimicrobiana de bacterias cultivadas en la Unidad de Cuidados Intensivos de Adultos. *Enfermedades Infecc y Microbiol* **32**, 127–133.
- Correa, M. F. (2008).** *Evaluación de caracteres PGPR en Actinomicetos e Interacciones de estas Rizobacterias con Hongos Formadores De Micorrizas.* Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana.
- Coyne, M. (2000).** *Microbiología del suelo: Un enfoque exploratorio.* Paraninfo S.A.
- Demain, A. L. (2002).** Prescription for an ailing pharmaceutical industry. *Biotechnology* **20**, 331.
- Dong-sheng, W., Quan-hong, X., Yun-yan, M., Xiao-li, W., Jie, C. & Fei, H. (2014).** Oligotrophy is Helpful for the Isolation of Bioactive Actinomycetes. *Indian J Microbiol* **54**, 178–184.
- Drew, S. W. & Demain, A. L. (1977).** Effect of primary metabolites on secondary metabolism. *Annu Rev Microbiol* **31**, 343–356. UNITED STATES.
- Ehrenreich, I. M., Waterbury, J. B. & Webb, E. A. (2005).** Distribution and Diversity of Natural Product Genes in Marine and Freshwater Cyanobacterial Cultures and Genomes. *Appl Environ Microbiol* **71**, 7401–7413.
- Espinosa, A. B. (2011).** *Actinobacterias aisladas del sedimento marino del golfo de California y de Bahía Todos Santos: diversidad, bioactividad y dominios cetosintetasa.* Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencia Marinas. Instituto de Investigaciones Oceanológicas.
- Felsenstein, J. (1985).** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution (N Y)* **39**, 783–791.
- Gerber, N. N. & Lechevalier, H. A. (1965).** Geosmin, an earthly-smelling substance isolated

from actinomycetes. *Appl Microbiol* **13**, 935–938.

González, L., Ayuso-Sacido, A., Anderson, A. & Genilloud, O. (2005). Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microb Ecol* **54**, 401–415.

Hakvåg, S., Fjærvik, E., Josefsen, K. D., Ian, E., Ellingsen, T. E. & Zotchev, S. B. (2008). Characterization of *Streptomyces* spp. Isolated from the Sea Surface Microlayer in the Trondheim Fjord, Norway. *Mar Drugs* **6**, 620–635.

Hernández, N. R. (2002). Visión actualizada de las infecciones intrahospitalarias. *Rev Cuba Med* **31**, 201–208.

Hogan, C. M. (2010). *Bacteria: In: Sidney Draggan* (Cleveland, Ed.). Encyclopedia of Earth, National. Council for Science and the Environment. Washington DC, USA.

Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H. & Shiba, T. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol* **21**, 526–531.

Izquierdo Altarejos, P. (2015). *Comparación de estrategias metagenómicas en muestras ambientales de biofilms*. Universidad Politécnica de Valencia.

Jiménez, D. P. (2011). *Aislamiento y caracterización preliminar de genes de policétido sintetas tipo I en actinomicetos aislados a partir de hormigas cortadoras de hojas Atta cephalotes*. Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela De Química De Bucaramanga.

Kennedy, J., Baker, P., Piper, C., Cotter, P. D., Walsh, M. & Mooij, M. J. (2009). Isolation and analysis of bacteria with antimicrobial activities from the marine sponge *Haliclona simulans* collected from Irish waters. *Mar Biotechnol* **11**, 384–396.

Ketela, M. M., Virpi, S., Halo, L., Hautala, A., Hakala, J., Mantsala, P. & Ylihonko, K. (1999). An efficient approach for screening minimal PKS genes from *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett* **180**, 1–6.

Kouadri, F., Al-Aboudi, A. & Khyami-Horani, H. (2014). Antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. isolated from the gulf of Aqaba-Jordan and screening for NRPS, PKS-I, and PKS-II genes. *African J Biotechnol* **13**, 3505–3515.

- Labarca, J. & Araos, R. (2009).** Resistencia antimicrobiana: problema en aumento y soluciones escasas. *Rev Chil Infectología* **26**, 8–9.
- Leiva, S., Yáñez, M., Zaror, L., Rodríguez, H. & García-Quintana, H. (2004).** Actividad antimicrobiana de actinomicetes aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. *Rev Medica Chil* **142**, 151–159.
- León, J. & García-Tello, P. (1998).** Cepas nativas del bacterioneuston marino y su actividad inhibitoria de bacterias ictiopatógenas. *Rev Peru Biol* **5**, 47–64.
- León, J., Liza, L. & Soto, I. (2007).** Actinomicetes bioactivos de sedimento marino de la costa central del Perú. *Rev peru Biol* **14**, 259–270.
- León, J., Aponte, J. J., Rojas, R., Cuadra, D., Ayala, N., Tomás, G. & Guerrero, M. (2011).** Estudio de actinomicetos marinos aislados de la costa central del Perú y su actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes y *Enterococcus faecalis* vancomicina resistentes. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* **28**, 237–246.
- Logan, N. (1994).** *Bacterial systematic*, Blackwell. Oxford New York. pp 272.
- Manteca, A., Claessen, D., López-Iglesias, C. & Sánchez, J. (2007).** Aerial hyphae in surface cultures of *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* originate from viable segments surviving an early programmed cell death event. *FEMS Microbiol Lett* **274**, 118–125.
- Manteca, A. & Sanchez, J. (2009).** Streptomyces development in colonies and soils. *Appl Environ Microbiol* **75**, 2920–2924.
- Manteca, A., Alvarez, R., Salazar, N., Yagiüe, P. & Sanchez, J. (2008).** Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol* **74**, 3877–3886.
- Martínez, Z. & Moreno-Enríquez, A. (2007).** Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos. *BioTecnología* **11**, 37–50.
- Medema, M. H., Trefzer, A., Kovalchuk, A., van den Berg, M., Muller, U. & Heijne, W. (2010).** The sequence of a 1.8-mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways. *Genome Biol Evol* **2**, 212–224.

- Nedal, A. (2007).** *Post-PKS modifications in the biosynthesis of the antifungal antibiotic nystatin.* Norwegian University of Science and Technology. Faculty of Natural Science and Technology. Department of Biotechnology.
- Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M. & Ikeda, H. (2008).** Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* **190**, 4050–4060.
- Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H. & other authors. (2001).** Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermectilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc Natl Acad Sci United States Am* **98**, 12215–12220.
- Parthasarathi, S., Sathya, S., Bupesh, G., Manikandan, M. & Kim, C. (2012).** Isolation, characterization and extraction of antimicrobial compounds from marine Actinomycete *Streptomyces hygroscopicus*. *J Biotechnol* **8**, 40–49.
- Pinto, S., Mann, M. B., Campos, F. S., Franco, A. C., Germani, J. C. & S, V. D. S. (2010).** Preliminary characterization of some *Streptomyces* species isolated from a composting process and their antimicrobial potential. *Microbiol Biotechnol* **26**, 1847–1856.
- Prashith, K. T. R., Vinayaka, K. S., Soumya, K. V, Ashwini, S. K. & Kiran, R. (2010).** Antibacterial and antifungal activity of methanolic extract of *Abrus pulchellus* Wall and *Abrus precatorius* Linn: A comparative study. *Int J Pharmacol Toxicol* **2**, 26–29.
- Prescott, L. (2004).** *Microbiología*, 5^o edn. McGraw-Hill-Interamericana.
- Rigali, S., Titgemeyer, F., Barends, S., Mulder, S., Thomae, A. W., Hopwood, D. A. & van Wezel, G. P. (2008).** Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *Eur Mol Biol Organ* **9**, 670–675.
- Rodicio, M. R. & Mendoza, M. C. (2004).** Identificación bacteriana mediante secuenciación de ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecc y Microbiol Clin* **22**, 238–245.
- Saadou, I. & Gharaibeh, R. (2002).** The *Streptomyces* flora of Jordan and its potential as a source of antibiotics active against antibiotic-resistant Gram-negative bacteria. *Microbiol Biotechnol* **18**, 465–470.

- Sagardoy, M. & Mandolesi, M. (2004).** Biología del suelo, 2da edn., p. 50. Bahía Blanca. Argentina: Universidad Nacional del Sur.
- Sanz, A. (2005).** *Aislamiento y caracterización de genes de la ruta biosintética de un antifúngico oxopentaeno producido por Streptomyces sp.* Universidad de Alcalá. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Centro Nacional de Biotecnología (CSIC).
- Shen, B. (2003).** Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr Opin Chem Biol* **7**, 285–295.
- Shirling, E. B. & Gottlieb, D. (1996).** Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* **16**, 313–340.
- Shirling, E. & Gottlieb, D. (1966).** Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* **16**, 317–327.
- Silambarasan, S., Praveen Kumar, E., Murugan, T., Saravanan, D. & Balagurunathan, R. (2012).** Antibacterial and antifungal activities of *Actinobacteria* isolated from Rathnagiri hills. *J Appl Pharm Sci* **2**, 99–103.
- Sletta, H., Borgos, S., Bruheim, P., Sekurova, O., Grasdalen, H., Aune, R., Ellingsen, T. & Zotchev, S. (2005).** Nystatin Biosynthesis and Transport: nysH and nysG Genes Encoding a Putative ABC Transporter System in *Streptomyces noursei* ATTC 11455 Are Required for Efficient Conversion of 10-Deoxynystatin to Nystatin. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 4576–4583.
- Soler Hernández, A. (2012).** *Biodiversidad de actinomicetos aislados de plantas depuradoras de aguas residuales. Estudio de la capacidad de biodegradación de compuestos tóxicos.* Universidad Politécnica de Valencia.
- Solera Segura, E. (2014).** *Caracterización de la agrupación de biosíntesis del inmunosupresor tacrolimus en dos especies del género Streptomyces. Estudio de regulación.* Departamento de Biología Molecular. Universidad de León.
- Srivibool, R. & Sukchotiratana, M. (2006).** Bioprospective of actinomycetes isolates from coastal soils: A new source of antimicrobial producers. *Songklanakarin J Sci Technol* **28**, 493–499.

- Strohl, W. R. (Ed.). (1997).** Industrial antibiotics: today and the future. In *Biotechnol Antibiot*, 2nd edn., pp. 1–47. New York: Marcel Dekker.
- Strohl, W. R., Bartel, P. L., Li, Y., Connor, N. C. & Woodman, R. H. (1991).** Expression of polyketide biosynth and regulatory genes in heterologous streptomycetes. *J Ind Microbiol Biotechnol* **7**.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013).** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**, 2725–2729. Oxford University Press.
- Thompson, J., Higgins, D. & Gibson, T. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673–4680.
- Turner, W. B. (1973).** Secondary metabolism with special reference to Actinomycetales. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* **2**, 209–217.
- Usha, R. J., Hema, S. N. & Kanchana, D. D. (2011).** Antagonistic activity of actinomycetes isolates against human pathogen. *J Microbiol Biotechnol Res* **1**, 74–79.
- Uzcátegui Negrón, M. del C., Serrano, J. A. & Panizo, M. M. (2013).** Condiciones de cultivo que fomentan la producción de sustancias antimicrobianas en actinomicetos patógenos y del suelo. *Rev la Soc Venez Microbiol* **33**, 134–139.
- Valli, S., Svathi Sugasini, S., Aysha, O., Nirmala, P., Vinoth Kumar, P. & Reena, A. (2012).** Antimicrobial potential of *Actinomycetes* species isolated from marine environment. *Asian Pac J Trop Biomed* **2**, 469–473.
- Vilches, C., Méndez, C., Hardisson, C. & Salas, J. a. (1990).** Biosynthesis of oleandomycin by *Streptomyces antibioticus*: influence of nutritional conditions and development of resistance. *J Gen Microbiol* **136**, 1447–1454.
- Volff, J. N. & Altenbuchner, J. (1998).** Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome. *Mol Microbiol* **27**, 239–246.
- Waksman, A. S. & Henrici, T. A. (1943).** The nomenclature and classification of the Actinomycetes. *J Bacteriol* **46**, 337–341.

Westerdahl, A., Olsson, J., Kjelleberg, S. & Conway, P. (1991). Isolation and characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Appl Environ Microbiol* **57**, 2223–22238.

WHO. (2001). Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. Geneva:WHO.

Zhi, X., Li, W. & Stackebrandt, E. (2009). An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 589–608.

Zucchi, T. D., Guidolin, A. S. & Cônsoli, F. L. (2011). Isolation and characterization of actinobacteria ectosymbionts from *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera, Formicidae). *Microbiol Res* **166**, 68–76.

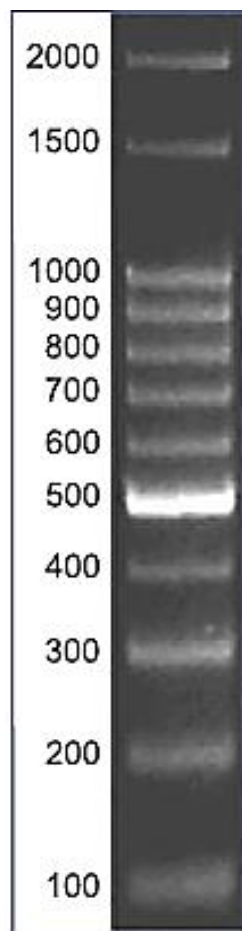
ANEXOS

Anexo I. Composición de los distintos medios de cultivos

MEDIO DE CULTIVO		COMPONENTES	g/L
	Agar Caseína Almidón	Almidón	10
	(ACA)	Caseína	1
	(León <i>et al.</i> , 2007)	Agar	15
	Agar Extracto de Levadura	Almidón	10
		Peptona Soja	2
	(EL)	Extracto de levadura	4
	(Espinosa, 2011)	Agar	15
		Rifampicina (antibiótico)	0,005
	Agar Sintético de Gause`s	Almidón	2
		KNO ₃	1
		K ₂ HPO ₃	0,5
		NaCl	0,5
		FeSO ₄	0,01
		(Dong-sheng <i>et al.</i> , 2014)	Agar
Caldo para la producción de metabolitos bioactivos	Caldo de fermentación con hidratos de carbono (CFHC)	Almidón	10
		Peptona Soja	4
		Extracto de levadura	1
		Glucosa	5
bioactivos	Caldo de fermentación sin hidratos de carbono (CF)	Peptona Soja	4
		Extracto de levadura	2

MEDIO DE CULTIVO	COMPONENTES	g/L
(León <i>et al.</i> , 2007)		
International Streptomyces Project (ISP 1) (Shirling & Gottlieb, 1966)	Caseína	5
	Extracto de Levadura	3
	Glucosa	20
	MgCl ₂	0,05

Anexo II. Marcador de peso molecular MA12 / LADDER de MASA.



Siembra: 5 µl
 Gel de agarosa: 1,5 %
 Corrida: 1 hora a 90 V
 Buffer de corrida: TAE 1X
 Tinción: BrEt 0,5 µg/ml

Consiste en doce fragmentos de ADN, mostrando rangos de 100 a 2000 pares de bases.

Anexo III. Número de acceso de las secuencias de ADNr 16S de las cepas de la base de datos Ribosomal Database Project (RDP).

CEPA	NÚMERO DE ACCESO
<i>S. antibioticus</i> NRRL B-1701	AY999776
<i>S. variabilis</i> NRRL B-3984T	DQ442551
<i>S. griseoincarnatus</i> LMG 19316	AJ781321
<i>S. erythrogriseus</i> LMG 19406	AJ781328
<i>S. griseorubens</i> NBRC 12780	AB184139
<i>S. labedae</i> NBRC 15864	AB184704
<i>S. pilosus</i> NBRC 12807	AB184161
<i>S. flavoviridis</i> NBRC 12772	AB184842
<i>S. lienomycini</i> LMG 20091	AJ781353
<i>S. flavovariabilis</i> NRRL B-16367	EF178691
<i>S. rochei</i> NBRC 12908	AB184237
<i>S. sporoclivatus</i> NBRC 100767	AB249934
<i>S. antimycoticus</i> NBRC 12839	AB184185
<i>Streptomyces aurantiacus</i> LMG 19358	AJ781383
<i>Streptomyces microflavus</i> NRRL B-2156	DQ445795
<i>Actinomadura cremea</i> JCM 3308T	AF134067
<i>Actinomadura glauciflava</i> NBRC 14668	AB184612
<i>Actinomadura sediminis</i> YIM M 10931;	JF272484
<i>Streptomyces bottropensis</i> NBRC 13023	AB184262
<i>Streptomyces collinus</i> NBRC 12759	AB184123

Anexo IV. Números de acceso provisionales a la base de datos NCBI, correspondiente a la selección de actinomicas terrestres.

CEPA	IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA	NÚMERO DE ACCESO
AC1B	<i>Streptomyces collinus</i>	KX215752
AC12B	<i>Streptomyces lienomycini</i>	KX215753
AC21B	<i>Streptomyces pilosus</i>	KX215754
AC45C	<i>Streptomyces sp.</i>	KX215755
AC47A	<i>Streptomyces antimycoticus</i>	KX215756
L60A	<i>Streptomyces sp.</i>	KX215757
L67A	<i>Streptomyces sp.</i>	KX215758
L67G	<i>Streptomyces rochei</i>	KX215759
AC69C	<i>Streptomyces antibioticus</i>	KX215760
L73M	<i>Actinomadura cremea</i>	KX215761
ACF82B	<i>Streptomyces flavovariabilis</i>	KX215762
ACF82D	<i>Streptomyces microflavus</i>	KX215763
AC87D	<i>Streptomyces bottropensis</i>	KX215764
