# Aislamiento y caracterización parcial de actinomicetos de suelos con actividad antimicrobiana contra bacterias multidrogo-resistentes

# Isolation and partial characterization of soils actinomycetes with antimicrobial activity against multidrug-resistant bacteria

# Aislamiento y caracterización de actinomicetos de suelos

Parada Romina B.\*, Marguet Emilio R. \*\*, Vallejo Marisol\*\*\*

\* Licenciada en Ciencias Biológicas. Laboratorio de Biotecnología Microbiana. Facultad de Ciencias Naturales (Sede Trelew). Universidad Nacional de la Patagonia. Argentina. parada.ro91@gmail.com

\*\* Doctor en Bioquímica. Laboratorio de Biotecnología Microbiana. Facultad de Ciencias Naturales (Sede Trelew). Universidad Nacional de la Patagonia. Argentina. emarguet@yahoo.com.ar

\*\*\* Doctora en Biología. Laboratorio de Biotecnología Microbiana. Facultad de Ciencias Naturales (Sede Trelew). Universidad Nacional de la Patagonia. Argentina. soltrelew@gmail.com

# Resumen

Con el objetivo de evaluar la actividad antimicrobiana frente a bacterias multi-drogo resistentes, se estudiaron 234 cepas de actinobacterias aisladas de suelo de Argentina y Perú. Se seleccionaron 13 cepas sobre la base de su actividad antagonista contra *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (SAMR) y *Enterococcus* resistente a vancomicina (EVR-van A y van B). La presencia de los genes NRPS, PKS-I y PKS-II fueron investigados por técnicas de PCR. Entre las 13 actinobacterias seleccionadas, la cepa AC69C mostró la mayor actividad en las pruebas de difusión en medio sólido y se evaluó posteriormente la producción de metabolitos antagonistas en medios líquidos. Los mejores resultados se lograron en caldo de fermentación con carbohidratos, al usarse en combinación almidón y glucosa. Se obtuvieron actividades antimicrobianas de 640 unidades arbitrarias (UA), 320 UA, 320 UA y 80 UA contra EVR-van A, EVR-van B, *Listeria monocytogenes* ATCC7644 y SAMR, respectivamente. La amplificación por PCR del gen ARNr 16S y el análisis filogenético subsecuente de la cepa AC69C exhibieron una homología del 100 % con *Streptomyces antibioticus* NRRL B-1701. No fue posible establecer una correlación entre los genes amplificados y la actividad antimicrobiana de las 13 cepas seleccionadas. Los resultados de este trabajo demuestran la amplia distribución de las actinobacterias en suelo y la importancia del aislamiento de cepas para la búsqueda de nuevos metabolitos activos contra bacterias multi-drogo resistentes de origen clínico.

**Palabras clave**: Actinobacterias, *Streptomyces*, metabolitos antimicrobianos.

# Abstract

Two hundred and thirty four actinobacteria strains were isolated from Argentinian and Peruvian soil in order to evaluate the antimicrobial activity against multidrug resistant bacteria On the basis of their antagonist activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and two vancomycin-resistant *Enterococcus* (EVR-Van A and EVR Van B),13 strains were selected. The presence of NRPS, PKS-I and PKS-II genes were also investigated by PCR techniques. Among the 13 selected actinobacteria, strain AC69C displayed the higher activity in diffusion tests in solid medium and was further evaluated for the production of antagonist metabolites in liquid media. The best results were obtained using fermentation broth with carbohydrates, when starch and glucose were used in combination. Antimicrobial activities of 640 arbitrary units (AU), 320 AU, 320 AU and 80 AU were obtained against EVR-Van A, EVR-Van B, *Listeria monocytogenes* ATCC7644 and MRSA, respectively. PCR amplification of 16S rRNA gene and subsequent phylogenetic analysis of AC69C strain displayed a 100 % homology with *Streptomyces antibioticus* NRRL B-1701. It was not possible to establish a correlation between the amplified genes and antimicrobial activity of the 13 selected strains. The results of this work show the wide distribution of actinobacteria in soil and the importance of the isolation of strain to screen novel active metabolites against multidrug resistant bacteria of clinical origin.

**Key words:** Actinobacteria, *Streptomyces*, antimicrobial metabolites.

**Recibido:** abril 18 de 2017 **Aprobado:** diciembre 4 de 2017

# Introducción

Los actinomicetos conforman un grupo ubicuo y heterogéneo de microorganismos Gram positivos, representan entre el 20 y 60 % de la población microbiana total del suelo, también pueden encontrarse en ambientes acuáticos tanto dulces como marinos (Kennedy *et al*., 2009; Hakvåg *et al*., 2008; Leiva *et al*., 2004). Son considerados microorganismos saprófitos, cumplen un importante rol en la descomposición de la materia orgánica y el ciclo del carbono mediante la producción de diversas enzimas hidrolíticas y ligninolíticas (Usha *et al*., 2011; Hogan, 2010).

La actividad metabólica de los actinomicetos, frecuentemente está acompañada por la producción de metabolitos secundarios (MS) de gran diversidad química, que desempeñan un papel primordial en el mantenimiento, señalización y colonización de su hábitat (González *et al*., 2005).

Las cepas del género *Streptomyces*, son productoras de la mayoría de los antibióticos de uso frecuente en clínica humana y/o animal. Se ha estimado que las especies de *Streptomyces* producen más del 50 % de los compuestos bioactivos microbianos que se han descubierto en los últimos 50 años (Berdy, 2012).

La mayoría de los antibióticos son MS extracelulares que normalmente son secretados al medio de cultivo y sirven como precursores para la biosíntesis de agentes anticancerígenos, fármacos, inmunorreguladores, antivirales y agentes antiparasitarios (Prashith *et al*., 2010).

La mayoría de los compuestos bioactivos sintetizados por actinomicetos corresponden a diversas estructuras químicas, como aminoglucósidos (estreptomicina y kanamicina), glicopéptidos (vancomicina), macrólidos (eritromicina), -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas), nucleósidos (puromicina), péptidos de síntesis no ribosomal (gramicidina, bacitracina), policétidos (actinorrudina, anfotericina), entre otros (Nanjwade *et al*., 2010).

Los antibióticos peptídicos de síntesis no ribosomal son producidos como MS por diversos microorganismos, siendo sintetizados por una o más péptido sintasas no ribosomal (NRPS) (Ayuso-Sacido & Genilloud, 2004).

Dentro de los MS con actividad antibiótica sintetizados por *Streptomyces* spp., se destaca un grupo de compuestos denominados policétidos y péptidos de síntesis no ribosomal, entre los cuales se encuentran sustancias de aplicación en medicina y biotecnología (Nikolouli & Mossialos, 2012).

La resistencia antimicrobiana ha emergido como uno de los principales retos en la salud pública, debido a la aparición de patógenos multidrogo-resistentes (MDR), aunado a la presencia de nuevos antibióticos (León *et al*., 2011). Esta resistencia se da por la aplicación de antibióticos de amplio espectro contra infecciones bacterianas, lo que ejerce una presión de selección (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).

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. En este sentido, la búsqueda de compuestos activos contra hongos, virus o cepas bacterianas resistentes a antibióticos, es de suma importancia.

En este estudio se evaluó el efecto antimicrobiano de actinomicetos aislados de suelos de Argentina y Perú sobre cepas de bacterias multidrogo-resistentes.

# Materiales y Métodos

## Origen de las muestras

Se recolectaron de 5-10 g de muestras de suelo a una profundidad entre 2-8 cm, se colocaron en bolsas de polietileno estéril y se conservaron a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

Las muestras de suelo se recolectaron en Argentina, principalmente en las provincias de Misiones, La Rioja, Mendoza, Rio Negro y Chubut, mientras que el resto de las muestras se obtuvieron de Perú, de los departamentos Amazonas, Lima, Loreto, Madre de Dios y San Martín.

## Aislamiento de los actinomicetos

El aislamiento de los actinomicetos se realizó a partir de un gramo de suelo, se colocó en 9 ml de agua estéril (dilución 10-1). Posteriormente, se las sometió a dos pre-tratamientos: uno físico que consistió en un calentamiento a 70 ºC durante 15 min (Jiménez, 2011) y otro químico en el cual se empleó fenol al 1,5 % por 2 h (Bredholt *et al*., 2008). Luego, se realizaron diluciones seriadas hasta obtener una dilución final 1 x 10-3 g/ml de muestra. De cada dilución se sembraron 100 µl en cajas de Petri con Agar Caseína Almidón (ACA), empleado como medio no selectivo para actinobacterias (Zucchi *et al*., 2011; Pinto *et al*., 2010), Agar Extracto de Levadura (EL), un medio estándar para el aislamiento y caracterización de *Streptomyces* (Espinosa, 2011), y Agar Sintético de Gause`s (SG) recomendado como medio oligotrófico para el aislamiento de actinomicetos bioactivos (Dong-sheng *et al*., 2014). A todos los medios se les adicionó cicloheximida (10 µg/ml), nistatina (20 µg/ml) y ácido nalidíxico (20 µg/ml). Las cajas de Petri se incubaron en posición invertida a 28 ºC durante 7-30 días. Se seleccionaron colonias con características de actinomicetos y se conservaron a 4 ºC en medios sólidos de ACA y EL, suplementados con glicerol al 10 % (Jiménez, 2011).

## Caracterización morfológica de los actinomicetos

Las cepas de actinomicetos se identificaron de acuerdo a sus características de crecimiento macroscópicas tales como textura, forma, color del micelio aéreo y del sustrato, y la producción de pigmentos difusibles en el medio de cultivo. Además, de observaciones microscópicas mediante la tinción de Gram.

## Microorganismos patógenos indicadores

Se utilizaron cepas de patógenos MDR como indicadoras de la actividad antimicrobiana de los actinomicetos, *Enterococcus* resistentes a vancomicina (ERV) (fenotipos Van A y Van B), *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SAMR), *Listeria monocytogenes* ATCC7644 (LM), *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa tipo A (KPC), *K. pneumoniae* betalactamasa de espectro extendido (BLEE) y *Pseudomonas aeruginosa* carbapenemasa tipo B (metalo carbapenemasa) (PAC), provenientes de muestras clínicas del Hospital Zonal de la ciudad de Trelew.

## Determinación de la actividad antibacteriana

La actividad antimicrobiana se determinó con el método de “doble capa” (Westerdahl *et al*., 1991), modificado por León & García-Tello (1998). Previamente se realizó una selección de los actinomicetos sobre la base de su actividad antimicrobiana contra ERV y SAMR; posteriormente de las cepas seleccionadas se determinó su actividad antagonista frente al resto de los patógenos mencionados anteriormente.

## Caldo de fermentación y prueba de su actividad inhibitoria

La producción de metabolitos bioactivos, de los actinomicetos seleccionados, se evaluó en tres medios líquidos: con hidratos de carbono (CFHC) (León *et al*., 2011), sin hidratos de carbono (CF) (León *et al*., 2007) y ISP 1 (International *Streptomyces* Proyect).

La reactivación de los actinomicetos se realizó a 28 ºC durante 3 días en 3 ml de caldo tripticasa soja (TS) (Britania, Argentina), posteriormente el contenido se utilizó para inocular los caldos líquidos descritos anteriormente. Una vez sembrado el inóculo se incubó en constante agitación (150 rpm) durante 7 días. Posteriormente el cultivo se centrifugó a 4.000 rpm durante 20 min, para obtener el sobrenadante libre de células que se conservó a -20 ºC hasta su uso.

## Título de la actividad antimicrobiana

La determinación cuantitativa de la actividad de los sobrenadantes se realizó por el método de difusión en placa (Vallejo *et al*., 2014). 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).

## Extracción de ADN

Las cepas de actinomicetos seleccionadas se incubaron de manera estática en caldo TS a 28 ºC durante 3 días. Posteriormente se centrifugaron a 12.000 *g* durante 5 min y el ADN se purificó utilizando el kit comercial Wizard Genomics Promega (Madison, Wisconsin, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

## Identificación genotípica

Mediante la reacción de PCR se amplificó el gen que codifica ARNr 16S con un termociclador Mastercycler® (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), usando los cebadores universales para procariotas 27F (5´-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´) y 1492R (5´-TACGGYTACCTTG TTACGACTT-3´). Los productos de la amplificación del PCR se enviaron a Macrogen Inc. (Seúl, Corea) para su secuenciación. Los electrofenogramas, se analizaron y editaron utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor. La identificación de las secuencias se determinó mediante la herramienta SeqMatch de la base de datos Ribosomal Database Project (RDP) (Cole *et al*., 2005), el porcentaje de similitud se obtuvo a través del parámetro S\_ab score (Izquierdo Altarejos, 2015).

## Análisis filogenético

El árbol filogenético se construyó con el programa MEGA 6.06 (Tamura *et al*., 2013) de acuerdo al método estadístico Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987), utilizando el método de sustitución de Tamura-Nei y con un valor de bootstrap de 1000 réplicas. El alineamiento múltiple de las secuencias se realizó mediante la herramienta Clustal W (Thompson *et al*., 1994). Las secuencias para la construcción del árbol filogenético pertenecen a cepas de colección y fueron obtenidas de la base de datos del RDP. Se escogió arbitrariamente a la secuencia de la cepa *Bacillus subtilis* como grupo externo.

## Detección de genes de metabolitos secundarios

Para la amplificación de los genes PKS I y NRPS se usaron los cebadores y protocolos descritos por Ayuso-Sacido & Genilloud (2004); mientras que la amplificación del PKS II se realizó de acuerdo con Ketela *et al*. (1999). Se realizó electroforesis en gel de agarosa para comparar el tamaño de las bandas amplificadas con el marcador de peso molecular MA12 Ladder de masa (100-2000 pb). 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 cámara horizontal a 70 V durante 1 h. 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.

# Resultados y Discusión

Se aislaron 234 cepas presumiblemente diferentes, se comprobó la conveniencia de usar distintos medios como estrategia para el aislamiento de actinobacterias. Se determinó que la mayoría de las cepas aisladas en el medio EL pertenecían al género *Streptomyces* sin embargo, el aislamiento de una cepa del género *Actinomadura* (L73M), demostró que el medio no es estrictamente selectivo para el género citado (Soler Hernández, 2012).

El pre-tratamiento con fenol, recomendado para inhibir el crecimiento de estreptomicetos y obtener otros géneros (Bredholt *et al*., 2008) no resultó adecuado para ese propósito; debido a que las dos cepas (ACF82B y ACF82D) seleccionadas a partir de esta técnica pertenecieron al género *Streptomyces.*

Las colonias de actinomicetos exhibieron características diferentes en los 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).

La actividad antimicrobiana de las cepas aisladas se evaluó contra las cepas patógenas SARM y ERV, mediante la prueba de la doble capa. Del total de cepas aisladas, 43 exhibieron actividad antagonista frente a SARM mientras que, 23 y 22 cepas mostraron antagonismo frente a ERV Van A y Van B, respectivamente.

Se seleccionaron 13 cepas (AC1B, AC12B, AC21B, AC45C, AC47A, L60A, L67A, L67G, AC69C, L73M, ACF82B, ACF82D y AC87B) sobre la base de su actividad frente a los tres patógenos evaluados.

Las 13 cepas de actinomicetos seleccionadas se evaluaron contra los patógenos restantes, siete cepas mostraron actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* y tres cepas (AC21B, AC45C y L67A) produjeron sustancias antimicrobianas para bacterias Gram positivas (*L. monocytogenes*) y negativas (*K. pneumoniae* KPC y *K. pneumoniae* BLEE). Las cepas AC12B, AC47A y L67G solo inhibieron los microorganismos indicadores ERV (Van A y Van B) y SARM. Ninguna de las cepas seleccionadas exhibió actividad antagónica contra *P. aeruginosa*. Los resultados de la actividad inhibitoria obtenidos en este estudio resultan comparables a los reportados en trabajos previos para el género *Streptomyces* (Kouadri *et al*., 2014; Silambarasan *et al*., 2012; Valli *et al*., 2012). La diferencia de actividad antagónica de los actinomicetos contras las bacterias Gram positivas y negativas puede deberse a la estructura celular de los Gram negativos, donde la membrana externa de polisacáridos actúa como una barrera y la ausencia de la misma en las Gram positivas puede aumentar la susceptibilidad de dicha célula a los compuestos antimicrobianos (Silambarasan *et al.*, 2012; Valli *et al.*, 2012). (Srivibool & Sukchotiratana, 2006) sugieren que un halo de gran actividad antimicrobiana indica más eficacia o mayor difusión de la sustancia o ambos, y la ausencia del halo indica una resistencia completa.

La producción de metabolitos bioactivos se realizó en medio líquido utilizando la cepa AC69C que exhibió la mayor actividad inhibitoria en medio sólido contra los patógenos Gram positivos evaluados (figura 1a). 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 (figuras 1b, 1c y 1d). El medio CFHC resultó el más eficiente para la producción de metabolitos inhibitorios, seguido por el CF y por último el medio ISP 1 (tabla 1).

Los resultados obtenidos con los medios empleados demuestra 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). La composición y las concentraciones de los componentes en los medios de cultivo están estrechamente relacionadas con las capacidades metabólicas del organismo productor que influyen en la biosíntesis de las moléculas bioactivas (Fourati-Ben Fguira *et al.*, 2005).

La identificación genotípica de cepas de actinomicetos seleccionadas, se realizó utilizando las secuencias de ADNr 16S derivadas de los electrofenogramas. La mayoría de las cepas presentaron una alta homología con el género *Streptomyces*, excepto la cepa L73M con mayor porcentaje de identidad con el género *Actinomadura*. Estos resultados se corroboraron mediante un análisis filogenético, utilizando las especies válidas para cada género, como especie fuera del grupo se eligió a *B. subtilis*. En el árbol se observa tres grupos, el primero perteneciente al género *Streptomyces*, el segundo al género *Actinomadura* y el tercero al grupo externo. La cepa AC69C se identificó como *S. antibioticus* con un 100% de actividad(Figura 2)*.* Las cepas AC45C, L67A y L60A no fue posible identificarlas a nivel de especie, por lo que podrían ser nuevas especies. Sin embargo, para comprobar esto será necesario realizar hibridaciones DNA:DNA y diversas pruebas confirmatorias tales como menaquinonas, ácidos grasos, lípidos polares, contenido en G+C, entre otras (Soler Hernández, 2012). La alta abundancia del género *Streptomyces* coincide con lo reportado por varios autores, destacando que este género representa el 70–95 % de los actinomicetos de suelo (Sagardoy & Mandolesi, 2004). Ninguna de las cepas de actinomicetos se relacionó filogenéticamente con especies patógenas.

Se evaluó la presencia de los genes PKS I, PKS II y NRPS en las cepas seleccionadas. Las cepas AC45C, L67G, ACF82B, y ACF82D exhibieron el producto de amplificación del gen NRPS, las cepas L67A y ACF82B amplificaron el gen PKS-I, ninguna amplificó el gen PKS-II.

Ayuso-Sacido & Genilloud (2004) detectaron entre 56,7 % y 79,5 % de genes PKS-I y NRPS respectivamente en actinomicetos; mientras que en *Streptomyces* los genes PKS-I y NRPS se detectaron con mayor frecuencia (79 % y 97 % 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 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. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Kouadri *et al.,* en el 2014 para aislados de *Streptomyces* marinos, donde no observaron dicha relación al analizar las amplificaciones de los genes NRPS y PKS-II. 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 alguna de las cepas aisladas puede indicar la carencia del gen o bien, que estas secuencias conservadas presentan una mayor tasa de variación a la esperada, comprobando que los cebadores utilizados no son los óptimos para amplificar la región de estudio. El genoma de *Streptomyces* presenta varios grupos de genes NRPS y PKS, esto puede indicar que un gran número de componentes potencialmente bioactivos aún están sin identificar (Kouadri *et al.*, 2014). Para determinar el efecto bactericida frente a los patógenos MDR o 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).

# Conclusión

El gran número de aislamientos obtenidos de muestras de Argentina y Perú demuestran la gran ubicuidad de las actinobacterias. El uso de diferentes medios de cultivo es una estrategia recomendable para lograr un mayor número de aislamientos.

La actividad inhibitoria sobre cepas MDR representa un parámetro conveniente para la selección de actinobacterias productoras de nuevos metabolitos bioactivos.

La detección de los genes PKS I, PKS II y NRPS no permitió resultados concluyentes sobre su relación con la producción de metabolitos activos.

Las pruebas *in-vitro* realizadas a la cepa AC69C demostraron la capacidad de producir compuestos bioactivos contra patógenos tipificados como MDR de importancia clínica. Son necesarios estudios adicionales tales como variables físico-químicas, componentes del medio y estudios genéticos que permitan determinar su potencial uso en diversos campos de la biotecnología microbiana.

# Agradecimiento

Los autores agradecen el apoyo financiero provisto por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (MINCyT) y el Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC), Proyectos bilaterales.

# Referencias bibliográficas

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.

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.

Berdy, J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *J Antibiot (Tokyo), 65,* 385–395.

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.

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 (Tesis doctoral). Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana. Universidad de Granada (Ed). p 260.

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.

Espinosa, A. B. (2011). Actinobacterias aisladas del sedimento marino del golfo de California y de Bahía Todos Santos: diversidad, bioactividad y dominios cetosintetasa (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencia Marinas. Instituto de Investigaciones Oceanológicas.p 101.

Fourati-Ben Fguira, L., Fotso, S., Ben Ameur-Mehdi, R., Mellouli, L. & Laatsch, H. (2005). Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. *Res Microbiol., 156,* 341–347.

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.

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

Izquierdo Altarejos, P. (2015). Comparación de estrategias metagenómicas en muestras ambientales de biofilms (Tesis de grado). Universidad Politécnica de Valencia. p 36.

Jiménez, D. P. (2011). Aislamiento y caracterización preliminar de genes de policétido sintasas tipo I en actinomicetos aislados a partir de hormigas cortadoras de hojas *Atta cephalotes* (Tesis doctoral). Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela De Química De Bucaramanga. p 109.

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. islated from the gulf of Aqaba-Jordan and screening for NRPS, PKS-I, and PKS-II genes. *African J Biotechnol., 13,* 3505–3515.

Leiva, S., Yáñez, M., Zaror, L., Rodríguez, H. & García-Quintana, H. (2004). Actividad antimicrobiana de actinomycetes 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). Actinomycetes 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.

Nanjwade, B. K., Chandrashekhara, S., Goudanavar, P. S., Shamarez, A. M. & Manvi, F. V. (2010). Production of antibiotics from soil-isolated actinomycetes and evaluation of their antimicrobial activities. *Trop J Pharm Res., 9,* 373–377.

Nikolouli, K. & Mossialos, D. (2012). Bioactive compounds synthesized by non-ribosomal peptide synthetases and type-I polyketide synthases discovered through genome-mining and metagenomics. *Biotechnol Lett., 34*, 1393–1403. Netherlands.

Pinto, S., Mann, M. B., Campos, F. S., Franco, A. C., Germani, J. C. & Van Der Sand, S. T. (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.

Sagardoy, M. & Mandolesi, M. (2004). Biología del suelo, 2da edn. Bahía Blanca. Argentina: Universidad Nacional del Sur. p 50.

Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol., 4,* 406–425.

Silambarasan, S., Praveen Kumar, E., Murugan, T., Saravanan, D. & Balagurunathan, R. (2012). Antibacterial and antifungal activites of Actinobacteria isolated fron *Rathnagiri hills*. *J Appl Pharm Sci., 2,* 99–103.

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 Valéncia (Ed.). p 239.

Srivibool, R. & Sukchotiratana, M. (2006). Bioperspective of actinomycetes isolates from coastal soils: A new source of antimicrobial producers. *Songklanakarin J Sci Technol., 28,* 493–499.

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 align- ment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res., 22*, 4673–4680.

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. 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.

Vallejo, M., Ledesma, P., Anselmino, L. & Marguet, E. (2014). Efecto de las condiciones de crecimiento y composición del medio de cultivo sobre la producción de bacteriocina de *Enterococcus mundtii* Tw56. *Rev Colomb Biotecnol., 16,* 174–179.

Valli, S., Svathi Sugasini, S., Aysha, O., Nirmala, P., Vinoth Kumar, P. & Reena, A. (2012). Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine enviroment. *Asian Pac J Trop Biomed., 2,* 469–473.

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,* 2223–2228.

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.

**Figura 1:** a) Actividad antimicrobiana de los actinomicetos AC69C y AC45C frente a *Listeria monocytogenes* ATCC7644 (LM), mediante la técnica de la doble capa. Título de la actividad antimicrobiana de la cepa AC69C frente a ERV (fenotipo Van A) en: b) caldo de fermentación con hidratos de carbono (CFHC), c) caldo de fermentación sin hidratos de carbono (CF) y d) caldo ISP1 (International *Streptomyces* Proyect).

**Tabla 1.** Actividad inhibitoria del actinomiceto AC69C mediante la prueba de difusión en placa.

|  |  |
| --- | --- |
|  | **Unidades Arbitrarias (UA)/ml** |
| ***Cepas Indicadoras*** | **CFHC** | **CF** | **ISP 1** |
| **ERV (Van A)** | 640 | 320 | 40 |
| **ERV (Van B)** | 320 | 320 | 40 |
| **LM** | 320 |  80 |  0 |
| **SAMR** |  80 |  40 |  0 |

\*ERV: *Enterococcus* resistente a vancomicina (fenotipos Van A y Van B); LM: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644; SAMR: *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. CFHC: Caldo de fermentación con hidratos de carbono; CF: Caldo de fermentación sin hidratos de carbono; caldo ISP 1: International *Streptomyces* Proyect.

**Figura 2.** Árbol filogenético construido según el método estadístico Neighbor-joining basado en la relación entre las secuencias del gen ARNr 16S de cepas aisladas de actinomicetos (▲). Los números internos de nodos corresponden a los valores de soporte de bootstrap (≥60 %). Entre paréntesis se muestran los números de acceso al GenBank. La secuencia de gen ARNr 16S de la cepa *B.subtilis* fue elegida arbitrariamente como secuencia externa al grupo. (Barra, 0,02 sustituciones por posición de nucleótidos).