



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Aplicación de métodos cromatográficos y bioautográficos para la determinación de actividad antibacteriana e identificación de la fracción activa frente a *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, de un extracto de actinobacteria marina “*Streptomyces sp.* MJG-05”

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: Orellana Córdova, Michelle Stefania

DIRECTOR: Cartuche Flores, Luis Emilio, M. Sc.

LOJA-ECUADOR

2016



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

Septiembre, 2016

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Magíster.

Luis Emilio Cartuche Flores

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: Aplicación de métodos cromatográficos y bioautográficos para la determinación de actividad antibacteriana e identificación de la fracción activa frente a *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, de un extracto de actinobacteria marina "*Streptomyces sp. MJG-05*", realizado por Orellana Córdova Michelle Stefania ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Agosto de 2016

f).....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Michelle Stefania Orellana Córdova declaro ser autora del presente trabajo de titulación: **Aplicación de métodos cromatográficos y bioautográficos para la determinación de actividad antibacteriana e identificación de la fracción activa frente a *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, de un extracto de actinobacteria marina “*Streptomyces sp. MJG-05*”**, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Luis Emilio Cartuche Flores director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f).....
Orellana Córdova, Michelle Stefania
C.I 1105877656

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi guía, por brindarme la fortaleza necesaria y llenarme de sabiduría para afrontar cada obstáculo que se me ha presentado, por regalarme confianza en mí misma para hoy culminar esta etapa de mi vida académica.

A mi Padre Luis Alfonso Orellana Armijos, porque atesoro cada momento que viví a su lado; por su amor incondicional y sus enseñanzas aquí en la Tierra; y por sus bendiciones derramadas desde el cielo que me han llevado a cumplir uno de mis sueños.

A mi Gabrielito, por haberme ayudado a madurar tempranamente y valorar la vida como el más grande regalo, a Él por brindarme la inspiración que cada día necesito; por ser mi ángel guardián.

A mi Madre Olivia Córdova Carrión, por todos sus cuidados y cariño, por los sacrificios que ha hecho por mí y me han convertido en lo que soy. Por ser mi guía desde pequeña, por llenarme de amor y aliento para no perder la esperanza.

A Manuel, por creer en mí en todo momento, por caminar a mi lado y nunca dejarme sola, por ser mi apoyo constante.

Al M.Sc. Luis Cartuche, por la dirección de este trabajo y por brindarme sus consejos y amistad, gracias a su ayuda logre culminar un peldaño en mi vida profesional.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios, por las infinitas bendiciones derramadas, por ser mi respuesta en la necesidad, mi refugio en la tormenta y mi fortaleza en la debilidad. Por brindarme esperanza cuando todo parecía perdido, por llenarme de sabiduría y bondad para no perder la fe y lograr mis propósitos.

A mi Padre que partió al cielo, por enseñarme que la educación ayuda a la persona a aprender a ser lo que es capaz de ser, por brindarme sus consejos siempre, por secar mis lágrimas como solo un Padre lo podría hacer, por llenarme de amor, por ser mi Gran Ángel, y por confiar en mí siempre.

A mi Madre, por ser la mujer luchadora y modelo que necesito, por ser mi amiga y brindarme cada consejo con sabiduría, por creer en mí. Porque cuando todos los caminos se cerraban, su puerta era la única siempre abierta. A Ella porque me dio todo sin pedirme nada.

A mi Gabrielito, por ser mi Ángel Guardián, por llenarme de inspiración y fortaleza, a él por ser mi más grande logro que partió al cielo. Por enseñarme que las obras de arte solo se entienden cuando sus artistas ya no están.

A mis hermanas, por ser mis mejores amigas, porque su amor no tiene sustituto, por cada abrazo y cada palabra de aliento durante esta etapa, gracias por mantenerme segura en mí caminar.

A mis sobrinos, porque soy muy afortunada en tenerlos, por todo su amor y ternura para mí. Por haberme llenado de alegría aún en los momentos difíciles.

A Manuel, porque la felicidad vino de su mano, por devolverme la fe que había perdido, por creer en mí y ser mi consejero.

Agradezco infinitamente al M.Sc. Luis Cartuche, por ser mi maestro, por brindarme sus conocimientos y supervisar este trabajo, gracias por haber confiado en mí y mis capacidades. Gracias por haberme ayudado a culminar mi carrera profesional.

A todos los docentes que he conocido a lo largo de mi vida académica, porque gracias a Ellos me formé en carácter para hacerle frente a la vida. A todos ellos, por ser un gran ejemplo a los que les debo mi éxito.

Agradezco a todos mis grandes amigos y amigas, porque la amistad es el ingrediente más importante en la receta de la vida, por siempre brindarme su cariño incondicional y sus sabios consejos, y por siempre acompañarme tanto en los buenos como en los malos momentos.

A todos ustedes, muchas gracias.

INDICE DE CONTENIDOS

PORTADA.....	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. Actinomicetos.....	6
1.1.1. Antecedentes.....	6
1.1.2. Características generales de los actinomicetos.....	6
1.1.3. Clasificación taxonómica.....	8
1.1.4. El género <i>Streptomyces</i>	9
1.2. Condiciones de crecimiento.....	10
1.2.1. Medios de cultivo.....	10
1.3. Metabolitos secundarios producidos por Actinomicetos.....	11
1.3.1. Antibióticos, producidos por Actinomicetos.....	12
1.4. Análisis cromatográfico.....	14
1.4.1. Cromatografía de columna.....	15
1.4.2. Cromatografía en capa fina (CCF).....	15
1.4.2.1. Factor de retardo (R_F).....	16
1.4.3. Cromatografía en gel (exclusión por tamaños).....	16
1.5. Actividad biológica.....	17

1.5.1.	Microdilución en caldo o agar.	18
1.5.2.	Concentración mínima inhibitoria (CMI).	18
1.6.	Bioautografía.	18
1.6.1.	Bioautografía en agar overlay.	19
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS.		20
2.1.	Esquema metodológico.	21
2.2.	Cultivo Microbiano.	22
2.2.1.	Reactivación de la cepa.	22
2.2.2.	Escalado del cultivo en medio A1.	22
2.3.	Obtención del extracto y sus compuestos.	22
2.4.	Cromatografía en gel.	23
2.4.1.	Primer Fraccionamiento.	23
2.4.2.	Segundo Fraccionamiento.	23
2.5.	Cromatografía en capa fina (CCF).	23
2.5.1.	Factor de retardo (R_F).	23
2.6.	Actividad antimicrobiana.	24
2.6.1.	Método de Microdilución en caldo.	24
2.6.2.	Cultivo Overnight.	24
2.6.3.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).	24
2.7.	Bioautografía.	25
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.		27
3.1.	Cultivo microbiano y obtención del extracto y sus compuestos.	28
3.1.1.	Reactivación de la cepa.	28
3.1.2.	Escalado del cultivo en medio A1.	28
3.1.3.	Extracción de los compuestos microbianos.	29
3.2.	Cromatografía en Gel de Sephadex® LH-20.	30
3.2.1.	Primer fraccionamiento (Fraccionamiento del extracto crudo).	30

3.2.2. Segundo Fraccionamiento (Fracción 2).	31
3.3. Actividad antimicrobiana.	32
3.3.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).	32
3.4. Bioautografía.	35
CONCLUSIONES.	40
RECOMENDACIONES.	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	42
ANEXOS.	45
ANEXO 1. MEDIOS DE CULTIVO PARA ACTINOMICETOS SUPLEMENTADOS AL 75% CON AGUA DE MAR ARTIFICIAL.	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los principales antibióticos producidos por Actinomicetos de acuerdo a su estructura química	13
Tabla 2. Microorganismos evaluados con sus respectivos medios de cultivo y condiciones de incubación	24
Tabla 3. Pesos en gramos (g) de las extracciones de Streptomyces "MJG-05".....	29
Tabla 4. Fraccionamiento cromatográfico del extracto final y los pesos totales. Fracción F2 con mayor peso total	31
Tabla 5. Fraccionamiento cromatográfico de la Fracción F2 y los pesos totales.....	32
Tabla 6. Actividad inhibitoria de las Fracciones del Extracto crudo.....	33
Tabla 7. Actividad Inhibitoria de las subfracciones de la Fracción 2 (F2) del extracto crudo.....	34
Tabla 8. Cálculos del Factor de Retardo (R_F) de los compuestos activos.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Filamentos de actinomicetos.....	7
Figura 2. Características morfológicas de los Actinomicetos.....	8
Figura 3. Relaciones taxonómicas y filogenéticas de la clase Actinobacteria, basadas en el análisis de las secuencias de la región 16S ADNr/ARNr.....	9
Figura 4. Comportamiento de Actinomicetos en medios de cultivo.....	11
Figura 5. Desarrollo ascendente de una placa de cromatografía en capa fina.....	16
Figura 6. Fórmula para determinar R_F	16
Figura 7. Separación de moléculas según su tamaño en cromatografía en gel.....	17
Figura 8. Esquema del desarrollo de la investigación.....	21
Figura 9. Cultivo cepa “MJG-05”.....	22
Figura 10. Placa de 96 pocillos para Actividad Biológica.....	25
Figura 11. Esquema de Bioautografía.....	26
Figura 12. Cultivo en caja Petri de <i>Streptomyces</i> sp. (“MJG-05”).....	28
Figura 13. CCF en CHCl_3 :MeOH (9:1), de la reunión de fracciones del extracto crudo de “MJG-05”.....	30
Figura 14. CCF en CHCl_3 :MeOH (9:1), de la reunión de subfracciones de la corrida cromatográfica en Sephadex® LH-20 de la Fracción F2.....	32
Figura 15. CCF en CHCl_3 :MeOH (9:1), de la reunión de fracciones de la corrida cromatográfica en Sephadex® LH-20 del Extracto final y la Fracción 2.....	36
Figura 16. CCF en CHCl_3 :MeOH (9:1) del extracto crudo y las fracciones del primer y segundo fraccionamiento. (CCF revelada con Óleum).....	36
Figura 17. Resultados de Bioautografía (5 μ l).....	38
Figura 18. Resultados de Bioautografía (1 μ l).....	38

RESUMEN

Del cultivo de *Streptomyces* "MJG-05" y mediante la extracción de los compuestos con AcOEt y $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$, se obtuvo finalmente 1,212g de extracto crudo. Mediante cromatografía en Sephadex® LH-20 empleando CHCl_3 :MeOH (1:1) se obtuvieron 31 fracciones (F1-F31) que se reunieron en 6 subfracciones (F1-F6); escogiéndose la subfracción F2 (debido a su peso y su alta actividad biológica) para un segundo fraccionamiento empleando una mezcla de Hex: CHCl_3 :MeOH (2:1:1), obteniéndose finalmente 7 subfracciones (F2_f1- F2_f7) reunidas por su similitud cromatográfica. En las pruebas de actividad biológica, se demostró que la Fracción F1 y F2 y, del segundo fraccionamiento F2_f2, presentaron la actividad antibacteriana más alta frente a *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, con valores de CMI entre 62,5 y 15,625 $\mu\text{g/ml}$. A través de la técnica de Bioautografía sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* se detectaron 5 manchas diferenciadas por sus respectivos factores de retardo, las mismas que presentaron zonas de inhibición del crecimiento bacteriano, revelado como ausencia de color por la no reducción de la sal de tetrazolio.

PALABRAS CLAVE: Actinomicetos, *Streptomyces*, Antibióticos, Cromatografía, Bioautografía.

ABSTRACT

From *Streptomyces*'s culture labeled as "MJG-05" and by means of the extraction with AcOEt and $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$, 1,212g of crude extract was obtained. By means of chromatography in Sephadex LH-20 using CHCl_3 :MeOH (1:1) 31 fractions were obtained (F1-F31) which were gathered in 6 subfractions (F1-F6). The subfraction F2 was chosen (due to its high yield and its good biological activity) for a second fractionation using a mixture of Hex: CHCl_3 :MeOH (2:1:1), where 7 subfractions were finally obtained (F2f1 - F2f7) gathered by his chromatographic similarity. In the tests of biological activity, there was demonstrated that the Fraction F1, F2 and F2f2, they presented the highest antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*, with CMI's values between 62,5 and 15,625 $\mu\text{g/ml}$. By means of Bioautography agar overlay with *Staphylococcus aureus* as the reference bacterium, there were detected 5 spots differentiated by his respective factors of delay, the same ones who presented zones of inhibition of the bacterial growth, revealed as absence of color due to the no reduction of the tetrazolio salt.

KEY WORDS: *Actinomycetes*, *Streptomyces*, Antibiotics, Chromatography, Bioautography.

INTRODUCCIÓN

Los actinomicetos se caracterizan por habitar principalmente en el suelo y el mar, y son considerados como microorganismos intermedios entre los hongos y las bacterias. Estos poseen aspecto filamentoso y, al igual que los hongos, la capacidad de segregar antibióticos. Estos microorganismos viven de forma saprofítica y degradan restos orgánicos, esta capacidad de descomposición que poseen es posible gracias a la producción de una amplia gama de enzimas extracelulares hidrolíticas. Este género posee capacidades metabólicas y fisiológicas diferentes entre sus habitantes terrestres y marinos, brindando así la posibilidad de encontrar nuevas entidades químicas con extensos potenciales farmacológicos (Arenas. R. 2011).

Existen múltiples enfermedades infecciosas causadas por bacterias y hongos patógenos, y no es de alarmarse que estos desarrollen una rápida resistencia antibiótica debido a las diferentes mutaciones que adquieren. También, algunos de los antibióticos que actualmente son usados poseen alta toxicidad por ello se propicia la búsqueda y el desarrollo constante de nuevos agentes antimicrobianos. En investigaciones anteriores realizadas por Evangelista. Z y Moreno. A. (2007), se demostró que los actinomicetos eran los organismos que con mayor frecuencia producían compuestos inhibidores del crecimiento de bacterias patógenas, cerca del 50% de las cepas aisladas presentaban algún compuesto activo principalmente contra bacterias Gram-positivas.

Debido a la importancia médica e industrial de los antibióticos desde hace cuarenta años y la importancia de los actinomicetos en la producción de antibióticos, se han realizado múltiples investigaciones debido al interés evidente de las aplicaciones industriales de este grupo microbiano (Leveau. J.Y & Bouix. M, 2000).

Los actinomicetos incluyen miembros del género *Streptomyces*, de los que se ha reportado que aproximadamente el 45,6% de los antibióticos son sintetizados por ellos, 16% por otros actinomicetos, 16,9% por otras bacterias y 21,5% por hongos (Lazzarini, Carvaletti, Toppo & Marinnelli, 2000).

En conclusión, los antibióticos constituyen la parte más importante de las aplicaciones industriales de los actinomicetos en especial de los *Streptomyces*. Estas moléculas de origen natural manifiestan a bajas concentraciones actividades biológicas de naturaleza principalmente antibacteriana, antifúngica, anticancerosa, antiviral o antiparasitaria (Leveau. J.Y & Bouix. M, 2000).

La presente investigación busca contribuir con la búsqueda de microorganismos útiles que aporten en la investigación de compuestos con actividad biológica relevante que ayuden a la lucha contra la resistencia microbiana, causada por agentes patógenos que afectan a toda la población, aumentando la tasa de mortalidad y morbilidad principalmente en los países en vías de desarrollo.

Para ello se realizó la obtención de un extracto seco de *Streptomyces* sp. (MJG-05) marino obtenido mediante maceración con Acetato de Etilo, Acetona y Resina estéril Amberlite® XAD- 7HP por medio del proceso de fermentación a partir de la cepa bacteriana. La identificación de la fracción responsable de la actividad antibacteriana se realizó mediante aislamiento por Cromatografía en gel de Sephadex® LH-20 del extracto crudo y de la fracción con mayor peso total y prometedora actividad biológica, utilizando como fase móvil los solventes Cloroformo:Metanol y diferencias de polaridad al incluir Hexano en la mezcla de elución. La determinación de la actividad antibacteriana de las fracciones resultantes se realizó por el Método de Microdilución en caldo, frente a dos microorganismos patógenos gram positivos, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*. Para la identificación de las fracciones responsables de la actividad inhibitoria se realizaron técnicas bioautográficas, utilizando la cepa *Staphylococcus aureus* como microorganismo de prueba.

CAPITULO I
MARCO TEÓRICO

1.1. Actinomicetos.

1.1.1. Antecedentes.

El orden Actinomycetales comprende 63 géneros y figura un grupo de microorganismos considerablemente distribuidos en ecosistemas naturales y tienen gran importancia por sus propiedades fisiológicas. Se caracterizan por ser organismos intermedios entre las bacterias y los hongos; y por habitar principalmente el suelo y el mar. Poseen aspecto filamentoso y la capacidad de segregar antibióticos, al igual que los hongos. Sin duda los actinomicetos son microorganismos de consideración para la disolución de la materia orgánica del suelo y la liberación de nutrientes de ella. En la actualidad gracias a varias investigaciones llegó a ser evidente su potencial como productores de antibióticos, aislándose a muchas bacterias con estructuras únicas y características muy propias del ambiente marino lo que las llevo a destacarse como los productores más comunes de agentes antimicrobianos (Thompson.L & Troeh.F, 2002).

1.1.2. Características generales de los actinomicetos.

Los actinomicetos se encuentran englobados en el Dominio Bacteria debido a las características que presentan como, su pared celular compuesta por péptidoglicano, el diámetro de sus hifas es inferior al de los hongos “0,5 a 2,0 μm ” (**Figura 1**) y la disposición de su material genético, típicamente procariota (Thompson.L & Troeh.F, 2002).

Estos microorganismos viven de manera saprofítica degradando restos orgánicos, gracias a la producción de una amplia gama de enzimas extracelulares hidrolíticas. Los actinomicetos se caracterizan por estar formados por grupos de microorganismos filamentosos Gram-positivos que presentan un alto contenido de guanina y citocina en su DNA (Thompson.L & Troeh.F, 2002).

Se distinguen fácilmente por presentar un olor típico a “tierra húmeda” debido a la producción de Geosmina la cual se percibe de manera indistinta en los actinomicetos de origen terrestre y marinos (León, J., Liza, L., Soto, I., Cuadra, D., Patiño, L., & Zepa, 2007). Los sedimentos marinos como fuente de actinomicetos bioactivos fue uno de los recursos menos explorados hasta hace poco, pero hoy en día constituye una de las fuentes más prometedoras (Thompson.L & Troeh.F, 2002).

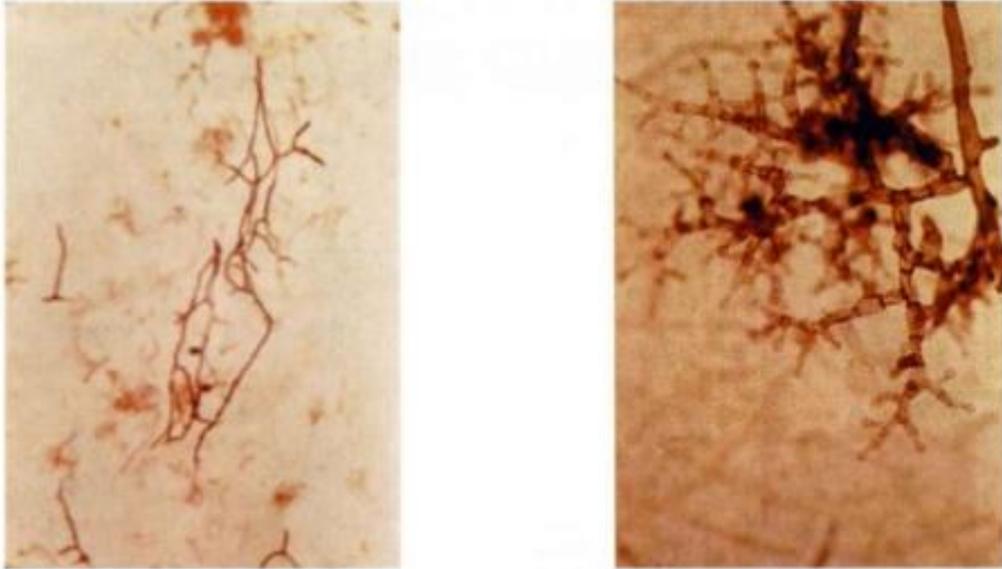


Figura 1. Filamentos de actinomicetos, -1 micra (izquierda) y fúngicos, +1 micra (derecha).
Fuente. Arenas, 2013.

Algunos son patógenos oportunistas y reúnen una amplia gama de microorganismos que van desde los bacilos difteroides hasta variantes miceliales complejas que se dividen perpendicularmente en elementos cocoides y bacilares. En medios sólidos, dan lugar a masas de filamentos y, en medios líquidos, tienden a formar racimos o lóbulos con ramificaciones dendríticas; producen esporas solas o en cadenas; pueden tener metabolismo oxidativo (aerobios) y encontrarse en la naturaleza, o fermentativo (anaerobios) y hallarse como parte de la flora endógena en cavidades de seres humanos y otros vertebrados (Arenas, 2013).

Recientemente, el estudio de estos microorganismos indica la disposición que poseen de sintetizar una gran colección de metabolitos secundarios con actividades biológicas diversas tales como: antitumorales, inmunosupresoras, antibióticas, herbicidas, inhibidores enzimáticos, pigmentos, aromas entre otras (Espliego, 1996).



Figura 2. Características morfológicas de los Actinomicetos.
Fuente. León, J., *et al*, (2007).

1.1.3. Clasificación taxonómica.

La utilidad que generan los actinomicetos por la gran diversidad de metabolitos secundarios y terapéuticos que generan, ha sido la base para llevar a cabo su clasificación. Los actinomicetos incluyen miembros de los géneros *Dietzia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, los géneros recién descritos *Salinispora* y *Marinispora* ambos de los cuales necesitan el agua de mar para su crecimiento (Manivasagan, Venkatesan, Sivakumar, & Kim, 2013). Algunos actinomicetos anaerobios tienen interés clínico, como *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* y *Rhotia*, y entre los aerobios *Nocardia*, *Actinomadura*, *Streptomyces*, *Corynebacterium* y *Dermatophilus* (Arenas, 2013).

A continuación, se detalla el árbol filogenético del número de géneros, órdenes y subórdenes de la relación intraclasses Actinobacteria (**Figura 3**) (Prescott, 2002).

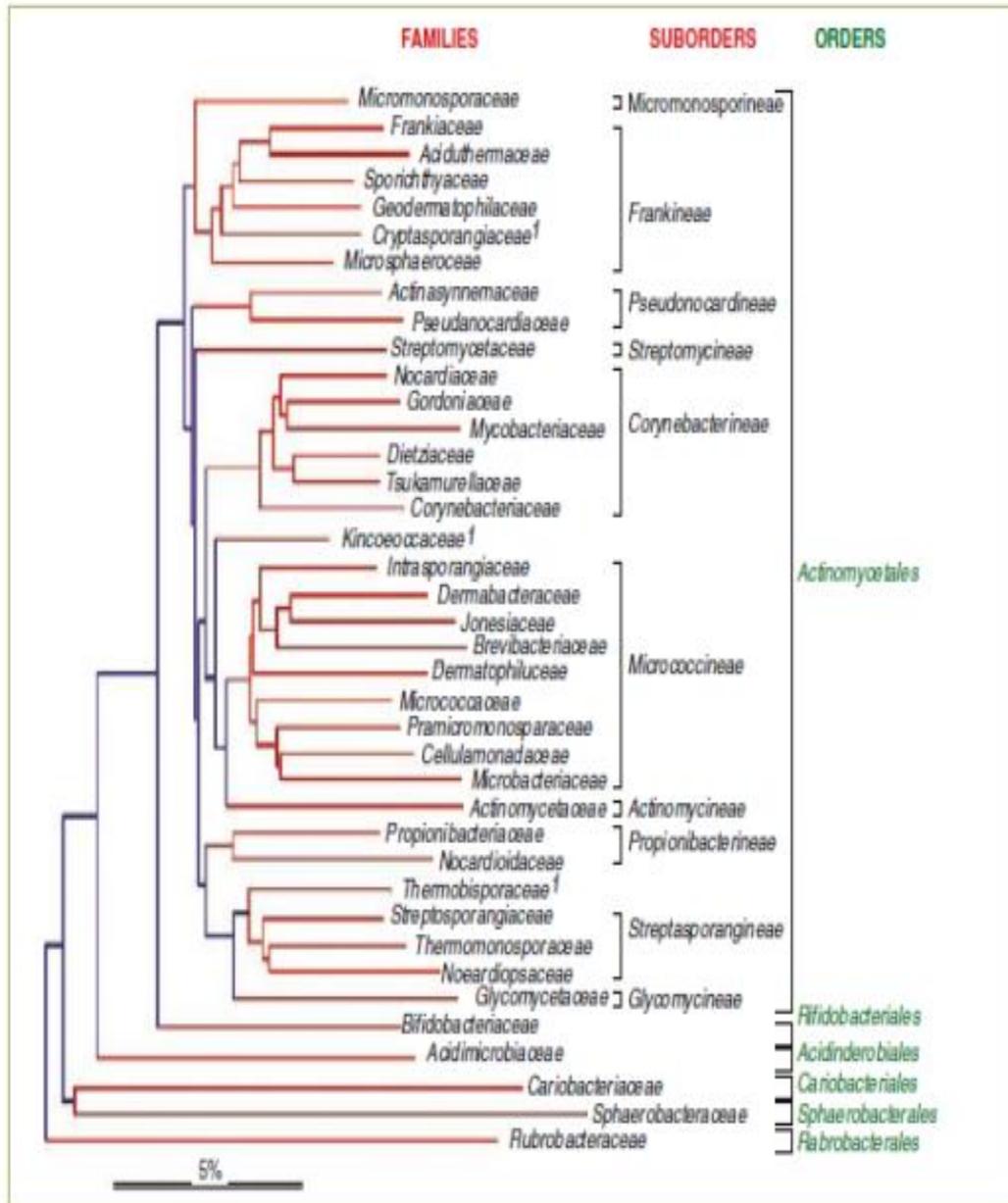


Figura 3. Relaciones taxonómicas y filogenéticas de la clase Actinobacteria, basadas en el análisis de las secuencias de la región 16S ADNr/ARNr.

Fuente. Dworkin et al., 2006.

1.1.4. El género *Streptomyces*.

Los microorganismos del mar son de notable interés debido a que son una nueva y prometedora fuente de compuestos biológicamente activos. Se ha confirmado mediante investigaciones que producen una variedad de metabolitos, algunos de los cuales pueden ser utilizados para el descubrimiento de medicamentos como los fármacos (Pietra, 1997).

Entre todos los géneros de Actinomicetos, el género *Streptomyces* posee el mayor número de especies y variedades, que se distinguen mucho en su morfología, fisiología y actividades bioquímicas. La mayoría de Actinomicetos productores de antibióticos son encontrados entre estas especies, lo que ha llevado a un crecimiento en la desarrollo e importancia economía de este grupo de organismos (Taddei, Rodríguez, Márquez-Vilchez, & Castelli, 2006).

A menudo este género de Actinomicetos sintetizan enzimas extracelulares que les permiten utilizar diversas materias orgánicas encontradas en el suelo, tales como proteínas, almidón, celulosa, etc. El género *Streptomyces* goza de gran importancia biotecnológica debido a que produce metabolitos secundarios tales como agentes anti infecciosos y anticancerígenos (Yuan & Crawford, 1995).

1.2. Condiciones de crecimiento.

Los actinomicetos son bacterias aeróbicas, gram positivas. El número y tipo de actinomicetos presentes en el suelo, están influenciados en gran medida por la ubicación geográfica, temperatura del suelo, tipo del suelo, pH del suelo, el contenido de materia orgánica, la aireación y el contenido de humedad (Bergey & Holt, 2000).

El desarrollo de estos microorganismos en los medios de cultivo depende de diversos factores, entre los más significativos están: Disponibilidad de los elementos nutritivos necesarios, existencia de oxígeno requerido, grado de humedad apropiado, valores de pH adecuados; usualmente neutro o ligeramente alcalino (7,2-7,4), temperatura de incubación específica (35-37°C), condiciones de esterilidad del medio y protección de posibles contaminaciones (García. P, Fernández. M, Paredes. F, 1997).

1.2.1. Medios de cultivo.

Un medio de cultivo está formado por sustancias generalmente complejas que facilitan el crecimiento de las bacterias. Éstas obtienen del medio las fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, potasio, sodio, magnesio y otros elementos o sustancias necesarias para su nutrición (García. P, *et al*, 1997).

Los actinomicetos crecen en varios medios microbiológicos, como son: agar nutritivo, tripticasa soja, agar malta levadura, agar sangre o agar infusión cerebro corazón. Sin embargo, para lograr su diferenciación y desarrollo de pigmentos o esporas, se pueden emplear algunos suplementos: D-glucosa (2,0%), extracto de malta (4,0%), extracto de levadura (0,4%), hidrógeno fosfatos dipotásico (0,5%), cloruro de sodio (0,25%), sulfato de zinc (0,004%), carbonato de calcio (0,04%) (Bergey & Holt, 2000).

Las colonias de actinomicetos en las placas de agar se puede observar a los 3 o 4 días de incubación, pero el desarrollo del micelio aéreo maduro con esporas puede tardar entre 7 y 14 días. Su crecimiento se puede distinguir de otro tipo de bacterias, ya que estos se desarrollan lentamente, presentando una consistencia pulverulenta y se adhieren fácilmente a la superficie del agar (Kishore, 2013).



Figura 4. Comportamiento de Actinomicetos en medios de cultivo.
Fuente. León, J., *et al*, (2007).

1.3. Metabolitos secundarios producidos por Actinomicetos.

Los metabolitos secundarios producidos por las plantas, cuyo uso contra enfermedades tiene su origen en la medicina tradicional, en contraste con, los compuestos de importancia farmacéutica adquiridos de microorganismos son el desenlace de amplias investigaciones de la naturaleza como productora de compuestos bioactivos (Evangelista y Moreno, 2007).

En los últimos años, el número de nuevos compuestos de interés médico farmacológico obtenidos de géneros de *Actinomyces* terrestres ya conocidos ha decrecido; en cambio a partir de *Actinomyces* marinos principalmente de las familias *Streptomycetaceae* y *Micromonosporaceae* han ido en aumento, considerándose por ello como potenciales productores prolíficos de importantes metabolitos secundarios (Kelecom, 2002; Jensen et al., 2005; Fiedler et al., 2005).

De varias investigaciones se obtuvo, que los actinomicetos eran los organismos que con mayor frecuencia producían compuestos inhibidores del crecimiento de bacterias patógenas, en particular cerca del 50% de las cepas aisladas de *Streptomyces* presentan algún compuesto activo principalmente contra bacterias Gram-positivas. Los metabolitos que producen son relativamente pequeños y al parecer no tienen una función determinada en el crecimiento celular. Dentro de estos metabolitos se encuentran los antibióticos, toxinas, pigmentos, agentes antitumorales, feromonas,

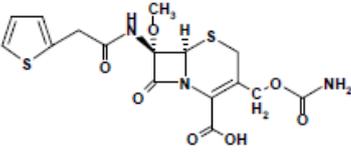
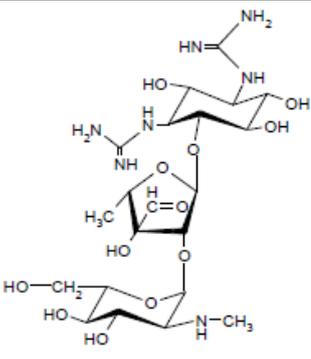
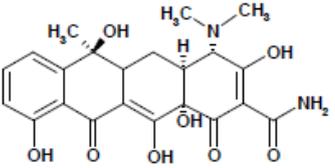
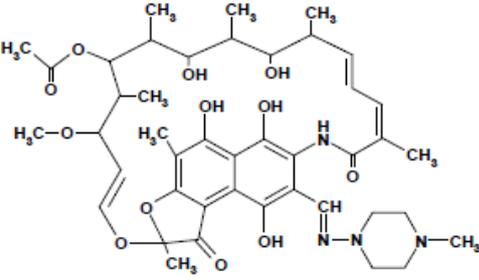
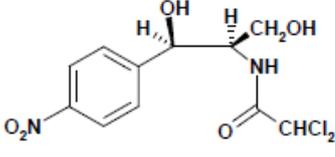
inhibidores enzimáticos, pesticidas y promotores del crecimiento en animales y plantas (Lazzarini, Carvaletti, Toppo & Marinnelli, 2000).

1.3.1. Antibióticos, producidos por Actinomicetos.

En las últimas décadas, la investigación se ha expandido desde la tierra al mar con el fin de encontrar nuevos candidatos potenciales para realizar drogas. Debido a que el océano ocupa casi el 70% de la superficie de la Tierra, los ecosistemas marinos comprenden un recurso continuo de actividades biológicas incalculables y entidades químicas numerosas. Teniendo en cuenta estos antecedentes, la química de productos naturales marinos ha ido progresando a un ritmo sin precedentes, lo que resulta en una multitud de descubrimientos de esqueletos de carbono y moléculas hasta ahora no vistos en la tierra. Esta diversidad ha proporcionado una fuente única de compuestos químicos con actividades biológicas potenciales que podrían llevar al descubrimiento de nuevos fármacos (Abad, M. J., Bedoya, L. M., & Bermejo, P, 2011).

Los antibióticos se distinguen de las demás clases de medicamentos debido a la selectividad de su mecanismo de acción. Estos poseen toxicidad selectiva contra algunos microorganismos, convirtiéndose en los compuestos que hoy en día se utilizan mayoritariamente en la terapia contra microorganismos patógenos. Algunos de los antibióticos producidos por los actinomicetos son los siguientes: β -lactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas, macrólidos, polienos, glicopéptidos, rifamicinas, fenicoles y azúcares complejos; su estructura química se detalla en la **Tabla 1** (Evangelista y Moreno, 2007).

Tabla 1. Clasificación de los principales antibióticos producidos por Actinomicetos de acuerdo a su estructura química.

CLASIFICACION	ANTIBIÓTICO	ESTRUCTURA
β-Lactámicos	Cefoxitina. (Cefamicina semisintética). Inhibe síntesis de pared celular.	
Aminoglucósidos	Estreptomina. Inhibe síntesis de proteínas. Unión en la subunidad ribosomal 30S.	
Tetraciclinas	Tetraciclina. Inhibe síntesis de proteínas. Unión en la subunidad ribosomal 30S.	
Rifamicinas	Rifampicina. Inhibición de síntesis de RNA. Unión a la RNA polimerasa.	
Fenicoles	Cloranfenicol. Inhibe síntesis de proteínas. Unión en la subunidad 50S.	

Macrólidos	<p>Eritromicina.</p> <p>Inhibe síntesis de proteínas. Unión en la subunidad ribosomal 50S.</p>	
Polienos	<p>Amfotericina B.</p> <p>Alteración de permeabilidad en la membrana.</p>	
Glicopéptidos	<p>Vancomicina.</p> <p>Inhibe síntesis de pared celular.</p>	
Azúcares complejos	<p>Lincomicina.</p> <p>Inhibe síntesis de proteínas. Unión en la subunidad 50S.</p>	

Fuente. Evangelista, Z. M., & Moreno, A. E., 2007.

Los antibióticos, a bajas concentraciones impiden el crecimiento de distintos microorganismos, aproximadamente el 16% de antibióticos son producidos por los Actinomicetos (Lazzarini, *et al*, 2000).

1.4. Análisis cromatográfico.

La cromatografía es una técnica analítica, donde se van a separar sustancias permitiendo su identificación, aprovechando su capacidad de ser retenidas por una fase fija o estacionaria y de ser arrastradas por una fase móvil o eluyente. Según el

instrumento utilizado se habla de cromatografía de columna, de papel, en placa delgada, etc. (Macarulla & Marino, 1992).

1.4.1. Cromatografía de columna.

En este método cromatográfico la fase estacionaria se dispone como el relleno de un recipiente cilíndrico, de vidrio, plástico o metal, abierto por ambos extremos que se denomina columna. Dicho relleno, también llamado lecho cromatográfico, ha de tener una estructura porosa a fin de que pueda fluir la fase móvil. El flujo estará propiciado por acción de la gravedad o por sistemas de bombeo de alta presión (García. J, Gavilanes. A, Montero. F, Oñaderra. M, Vivanco. F, 1999).

Este tipo de cromatografía se caracteriza por el íntimo contacto entre la fase móvil y estacionaria. Para conseguirlo es necesario evitar la formación de grietas y acanaladuras en el lecho cromatográfico, ya que de existir, la fase móvil va a circular por estas de formaciones, en lugar de por los intersticios entre partículas, disminuyendo el contacto entre fases (García. J, *et al*, 1999).

En este tipo de cromatografía se suele medir los llamados “tiempos de retención” tanto de los problemas como de los patrones, y se someten a comparación cuantitativa (Macarulla & Marino, 1992).

1.4.2. Cromatografía en capa fina (CCF).

La cromatografía en capa fina se basa en la separación de una mezcla de dos o más compuestos, permite la utilización de cualquier sustancia que pueda ser finamente dividida y preparada en una lámina uniforme. Esto incluye sustancias inorgánicas como el gel de sílice, óxido de aluminio, tierra de diatomeas y silicato de magnesio, y sustancias orgánicas como la celulosa, poliamida y polietileno en polvo (Abbott & Andrews, 1970).

En la cromatografía en capa fina, la fase estacionaria es una lámina (0,25-0,5mm) de sorbente extendido de forma uniforme sobre la superficie de una placa de vidrio o plástico. La muestra se aplica con una micropipeta sobre la placa y se seca. La placa CCF se coloca en una cámara que contiene el disolvente y se desarrolla por cromatografía ascendente (**Figura 5**). Cuando el frente del disolvente ha alcanzado casi el extremo superior, se quita la placa de la cámara y se seca. Las manchas se localizan, por su color natural, por fluorescencia o pulverizando reactivos (Freifelder, 1991).

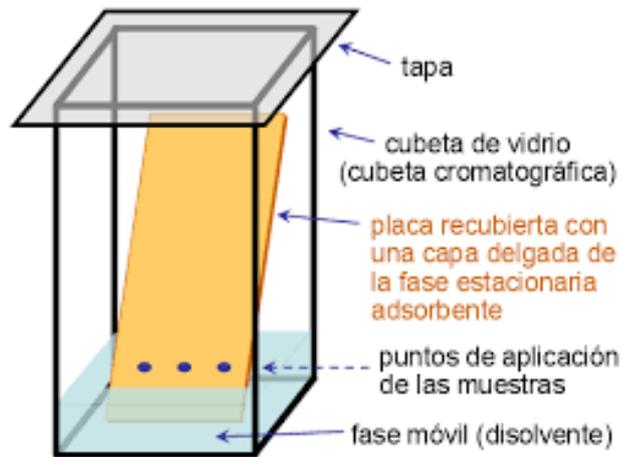


Figura 5. Desarrollo ascendente de una placa de cromatografía en capa fina.
Fuente. Freifelder, 1991.

1.4.2.1. Factor de retardo (R_F).

El factor de retardo (R_F) de un determinado analito se define como la relación entre la velocidad de desplazamiento del soluto y la velocidad de desplazamiento de la fase móvil. En un determinado instante, el factor de retardo puede definirse como una relación de distancias (Freifelder, 1991).

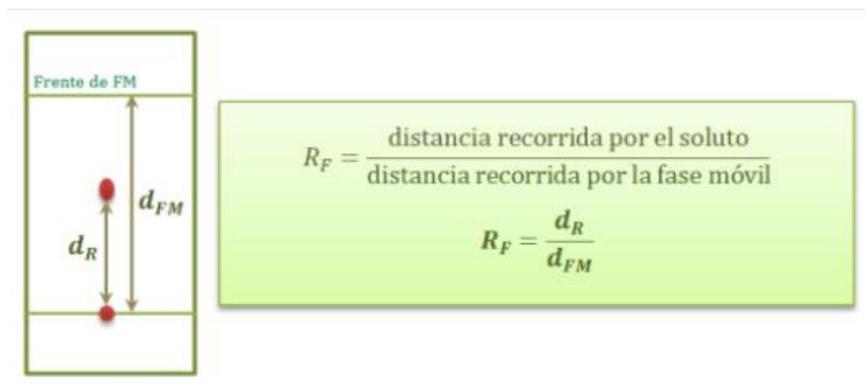


Figura 6. Fórmula para determinar R_F .
Fuente. Freifelder, 1991.

El factor de retardo varía desde 1 para los solutos que no se retrasan, hasta los valores que se aproximan a 0 (Freifelder, 1991).

1.4.3. Cromatografía en gel (exclusión por tamaños).

La cromatografía en gel es un tipo especial de cromatografía de reparto, en la que la separación se basa en el tamaño molecular (Freifelder, 1991). Las moléculas con un tamaño significativamente menor que el de los poros atraviesan la columna entera sin ser retenidos. Los solutos demasiado grandes tampoco resultan retenidos, pero las

moléculas intermedias se separan en función de su tamaño (Alexander & Griffiths, 1993).

Para la ejecución de este tipo de cromatografía, se debe preparar una columna de partículas muy finas de una sustancia inerte, que contenga poros muy pequeños. Como resultado las moléculas son eluidas de la columna por orden de tamaños decrecientes (**Figura 7**) (Freifelder, 1991).

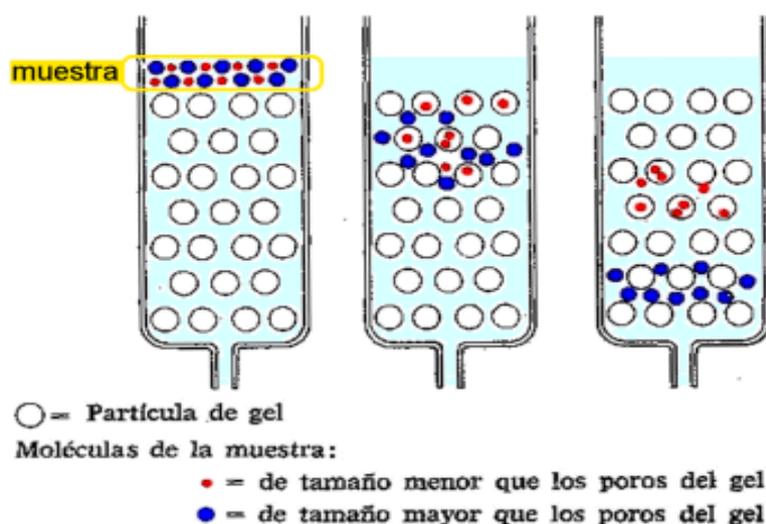


Figura 7. Separación de moléculas según su tamaño en cromatografía en gel.
Fuente. Freifelder, 1991.

1.5. Actividad biológica.

La actividad biológica es fundamental para seleccionar nuevos antimicrobianos y para la evaluación de la susceptibilidad a los antibióticos. Las pruebas antimicrobianas deben ser idealmente sencillas, rápidas, reproducibles, de bajo costo y deben maximizar el flujo de muestras con el fin de evaluar a un variado número de extractos y fracciones (Leveau. J.Y & Bouix. M, 2000).

Esta prueba de sensibilidad debe realizarse sólo sobre microorganismos asociados a infecciones cuando su sensibilidad no se pueda predecir a partir de su identificación. La determinación de la sensibilidad se recomienda cuando el microorganismo causante de la infección pertenece a una especie capaz de exhibir resistencia a los antibióticos. Los mecanismos de resistencia a los agentes antimicrobianos incluyen: producción de enzimas inactivantes, alteraciones en el sitio de acción y modificaciones en el ingreso o el eflujo de las drogas (Malbrán. C, 2001).

Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI), ha estandarizado el agar como el método ideal para la determinación cuantitativa de los antibióticos; y el método en caldo

(método de dilución) es utilizado para la determinación de la actividad inhibitoria (Leveau. J.Y & Bouix. M, 2000).

1.5.1. Microdilución en caldo o agar.

Las técnicas de dilución en caldo o agar, se pueden utilizar para medir cuantitativamente la actividad "in vitro" de un antimicrobiano frente a un cultivo bacteriano. Estos métodos se basan en la preparación de una serie de tubos o placas con caldo o agar, respectivamente, a los cuales se les agrega el antibiótico (ATB) en distintas concentraciones. Luego se inoculan cada uno de los tubos o placas con una suspensión del microorganismo en estudio. Las pruebas se examinan después de incubar "overnight" a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y se determina la concentración mínima inhibitoria (CMI) del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado (Malbrán. C, 2001).

El método de microdilución en caldo se denomina así porque involucra pequeños volúmenes de caldo. La prueba se realiza en policubetas de plástico estériles de fondo cónico o redondo, donde cada pocillo debe contener 0,1 ml de caldo (Malbrán. C, 2001).

1.5.2. Concentración mínima inhibitoria (CMI).

El valor de CMI obtenido por el método de dilución, orienta a los expertos en salud sobre que concentración de antibiótico necesita alcanzar en el sitio de infección para inhibir el microorganismo infectante (Malbrán. C, 2001).

La determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI), para los patógenos específicos, proporciona datos, que conjuntamente con los parámetros farmacocinéticos, permiten predecir la eficacia "in vivo" del compuesto en el tratamiento de una enfermedad específica (Ruiz, Ramírez, & Arroyave, 2001). Sin embargo, no representa un valor absoluto. La CMI real puede estar entre la menor concentración de antibiótico que inhibe al microorganismo y la siguiente donde se observa desarrollo del mismo (Malbrán. C, 2001).

1.6. Bioautografía.

La bioautografía es un método de detección microbiana con técnicas de cromatografía plana. Su procedimiento es similar al utilizado en los métodos de difusión en agar. La muestra será inoculada en la superficie del agar por algunos minutos u horas para permitir la difusión. A continuación, se retira la placa y la capa de agar se incuba. Las zonas de inhibición de crecimiento aparecen en los lugares, donde los compuestos antimicrobianos estaban en contacto con la capa del agar. Los tipos de bioautografía son: por contacto, por inmersión y bioautografía directa (Choma. I.M & Grzelak. E.M, 2011).

1.6.1. Bioautografía en agar overlay.

El principio de este método se basa en que una placa de CCF previamente preparada con los distintos extractos, se sumerge en un medio que le ayuda a humectarse, esto con el fin de facilitar la difusión del agar previamente sembrado con el microorganismo a estudiar. La superficie de sílice de la placa CCF quedará cubierta del medio de agar que se convertirá en una fuente de nutrientes, así permitiendo el crecimiento de los microorganismos directamente en él (Choma. I.M & Grzelak. E.M, 2011).

Posteriormente a un período de incubación, serán usados reactivos de detección de actividad deshidrogenasa; los más comunes son las sales de tetrazolio. Como resultado, la deshidrogenasa de microorganismos que sobreviven será convertida en sal de tetrazolio intensamente coloreada de formazano, esto debido a que las células vivas y metabólicamente activas son capaces de reducir la sal de tetrazolio, de color amarillo en solución a formazán, compuesto insoluble que precipita en forma de cristales violeta, evidenciando de esta forma actividad metabólica, y las zonas no coloreadas nos indican la presencia de agentes antibacterianos (Choma. I.M & Grzelak. E.M, 2011).

CAPÍTULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Esquema metodológico.

Para el desarrollo de la investigación se realizó la siguiente metodología, (Figura 8).

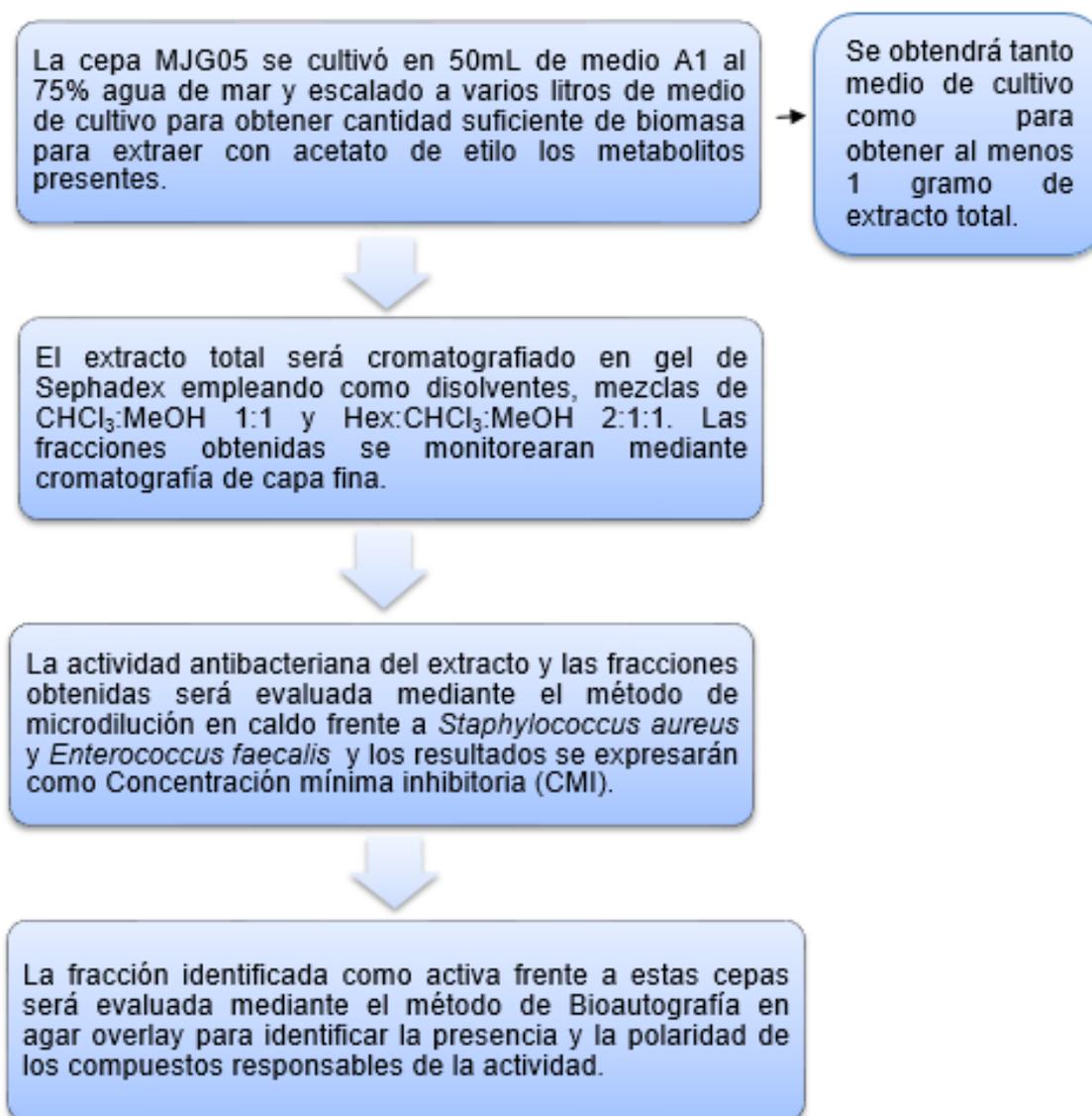


Figura 8. Esquema del desarrollo de la investigación.
Fuente. Autora.

2.2. Cultivo Microbiano.

2.2.1. Reactivación de la cepa.

La cepa de *Streptomyces* "MJG-05" fue cultivada en 50mL de medio A1 (Almidón+ peptona+ extracto de levadura+ carbonato de calcio) al 75% en agua de mar artificial, a partir del cultivo en caja Petri o reserva criogénica mantenida a -86° C. En el ANEXO 1 se describen los porcentajes de los constituyentes del medio y del agua de mar artificial.

2.2.2. Escalado del cultivo en medio A1.

Este cultivo se escaló a 13L en frascos Fernbach de 2.8L, con el fin de obtener biomasa para la obtención de una cantidad representativa de extracto, aproximadamente 1g de extracto seco.

En la **Figura 9** se observa el esquema del cultivo de la cepa "MJG-05".

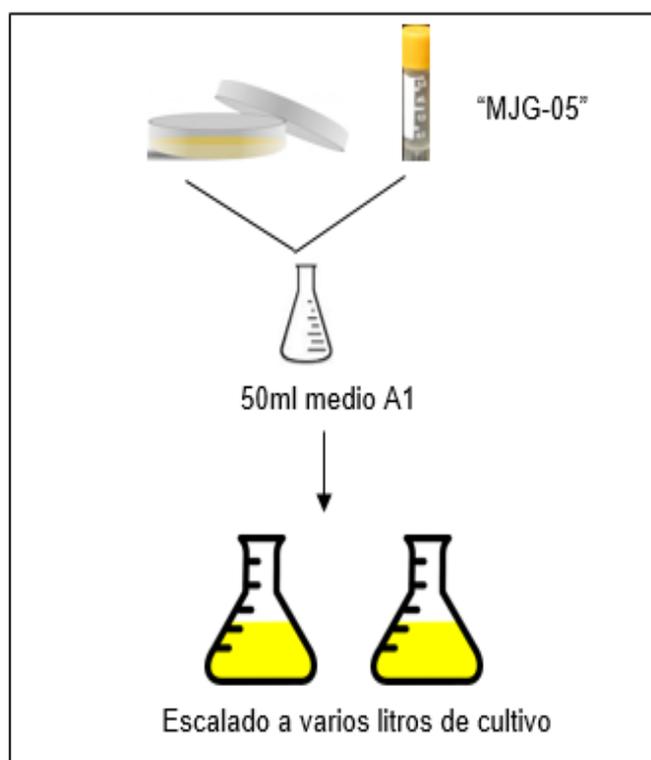


Figura 9. Cultivo cepa "MJG-05".

Fuente. Autora.

2.3. Obtención del extracto y fracciones.

Posterior a la reactivación de la cepa "MJG-05" en 1L de medio A1, se realizó el tratamiento con resina estéril Amberlite® XAD-7HP (SIGMA) utilizando aproximadamente 5g por 1L. Previamente al tratamiento, fue necesario lavar con metanol y agua destilada durante 20min por dos ocasiones la resina.

Se coloca la resina en 1L de medio que contiene la bacteria y se agita durante dos horas, posterior a ello se filtra para extraer la biomasa con 200mL de acetona y 800mL de acetato de etilo, es necesario dejar la biomasa con los solventes en agitación durante la noche para luego ser filtrada nuevamente y con ello obtener el extracto que debe ser concentrado en el rota vapor, y ser extraído con CHCl_3 : MeOH (1:1).

2.4. Cromatografía en gel.

2.4.1. Primer Fraccionamiento.

El extracto total fue cromatografiado en gel de Sephadex® LH-20, para ello primero se limpió el gel con 1L de metanol al 100% y con 800mL de la mezcla de CHCl_3 : MeOH (1:1) fue estabilizado.

El extracto final del *Streptomyces* "MJG-05" fue de 1,212g, donde 212mg fueron separados y 1g restante se eluyó en una mezcla 1:1 CHCl_3 :MeOH, para posteriormente ser centrifugado durante 15 minutos a 3000 r.p.m extrayendo el sobrenadante como producto final, luego fue sembrado cuidadosamente sobre el Sephadex® LH-20 con una pipeta pasteur se fraccionó con la mezcla (1:1) CHCl_3 :MeOH.

2.4.2. Segundo Fraccionamiento.

Este se realizó con la fracción F2 resultante de la unión del fraccionamiento del extracto final de "MJG-05"; para ello se debió limpiar el gel de Sephadex® LH-20 con 500mL de metanol y se estabilizó la columna con 400mL de la mezcla Hex: CHCl_3 :MeOH (2:1:1).

Posteriormente, se sembró con una pipeta pasteur el extracto de la fracción dos y las fracciones se obtuvieron con la mezcla antes mencionada.

2.5. Cromatografía en capa fina (CCF).

El extracto del *Streptomyces* "MJG-05" y cada fracción obtenida de las columnas en gel, fueron sembradas en cromatofolios de aluminio sílicagel G60 F254, que es colocada en una cámara que contiene CHCl_3 :MeOH (9:1) y se desarrolla por cromatografía ascendente, hasta que el frente del disolvente ha alcanzado casi el extremo superior, luego se quita la placa de la cámara y se deja secar para luego ser visualizadas a luz UV (254 y 365nm) y reveladas con Óleum (Composición del Óleum: AcOH: 80%, H_2O : 16%, H_2SO_4 : 4%).

2.5.1. Factor de retardo (R_F).

Para la identificación del compuesto o la fracción activa fue necesario calcular el R_F , para ello es necesario previamente medir con una regla cada mancha cromatográfica, desde la línea inferior de la placa CCF hasta donde se encuentra la mancha de la cromatografía y anotar los valores, para luego a partir de la fórmula calcular el R_F del compuesto o

fracción que presente actividad en la Bioautografía. La fórmula se describe en el apartado 1.4.2.1.

2.6. Actividad antimicrobiana.

2.6.1. Método de Microdilución en caldo.

Para determinar la susceptibilidad microbiana, se prepararon soluciones de 1, 3 y 5mg de los distintos extractos en 140, 150 y 250µl de Dimetil sulfóxido (DMSO).

2.6.2. Cultivo Overnight.

Se prepararon los inóculos bacterianos de *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* a partir de las reservas criogénicas mantenidas a -86°C, en los medios de cultivo específicos para cada cepa bacteriana, Medio Tripticasa Soja y Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI), respectivamente.

Tabla 2. Microorganismos evaluados con sus respectivos medios de cultivo y condiciones de incubación.

Bacterias	Medios de cultivo	Condiciones de incubación
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Caldo Mueller Hinton (Difco)	Temperatura: 37°C Horas: 14-16
<i>Proteus vulgaris</i>		
<i>Enterococcus faecalis</i>	Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Caldo Tripticasa Soja	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
<i>Escherichia coli</i>		
<i>Salmonella typhimurium</i>	Caldo Oxoid	

Fuente. Autora.

2.6.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

En placas de 96 pocillos se realizó el ensayo: Para iniciar, se colocó 100µl de Medio Mueller Hinton en todos los pocillos, luego en la primera fila (A-12) se añaden 80µl más de mismo medio. En la primera fila (A-9) se colocó 20µl de los extractos con los que se realizará la prueba. Es necesario contar con un control de esterilidad en A10, donde se colocará 20µl más de medio, un control positivo en A11 colocando 20µl de DMSO y un control negativo en A12 donde se colocarán 20µl de antibiótico (Tetraciclina).

Luego, se harán diluciones seriadas tomando 100µl de la primera fila (A-12) y diluyendo con 100µl de la fila siguiente (B-12), al llegar a la última fila (H-12) se eliminarán 100µl. Y por último, se debe colocar 100µl de inóculo de bacteria en todas las filas exceptuando el control de esterilidad. La incubación se realizó a 37°C durante 24 horas.

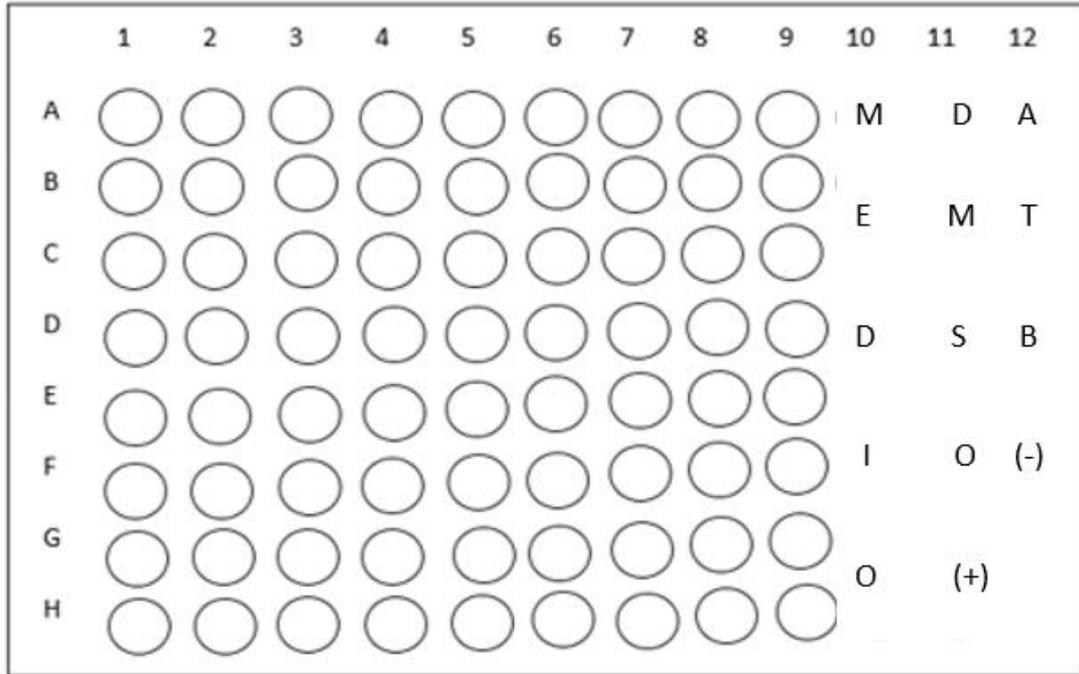


Figura 10. Placa de 96 pocillos para Actividad Biológica.
Fuente. Autora.

2.7. Bioautografía.

Para determinar la fracción activa frente a *Staphylococcus aureus*, primero se sembró por duplicado en placas CCF directa todos los extractos, utilizando capilares calibrados con dosis de 1; 2 y 5µl, para ello en distintos tubos Ependorf se colocó 1mg de cada fracción y se disolvió con 100µl de la mezcla CHCl₃:MeOH (1:1). Las placas CCF directa se corrieron con la misma mezcla a concentración 9:1 y se observó en la cámara UV a 254 y 365nm, esto con el fin de señalar las manchas cromatográficas y luego proceder a medirlas.

Es necesario para la prueba bioautográfica realizar el cultivo overnight descrito anteriormente en el apartado 2.6.1. Luego, se colocó en un tubo Ependorf 100µl del microorganismo prueba *Staphylococcus aureus*, más 900µl de Caldo Tripticasa Soja, esto con el fin de diluirla; posterior a ello se tomó 25µl de la dilución de la bacteria y se colocó en distintos frascos con 5ml de Agar Tripticasa Soja.

Por último, se hidrataron las placas con Caldo Tripticasa Soja y se colocó de manera uniforme en toda la placa, aproximadamente 1ml de bacteria sembrada en Agar Tripticasa Soja. La incubación se realizó a 37°C durante 24 horas.

Posteriormente al período de incubación, se revelaron las placas con el reactivo de sal de tetrazolio. Como resultado, las zonas no coloreadas nos indican la presencia de agentes antibacterianos.

Se utilizó Tetraciclina como control positivo.

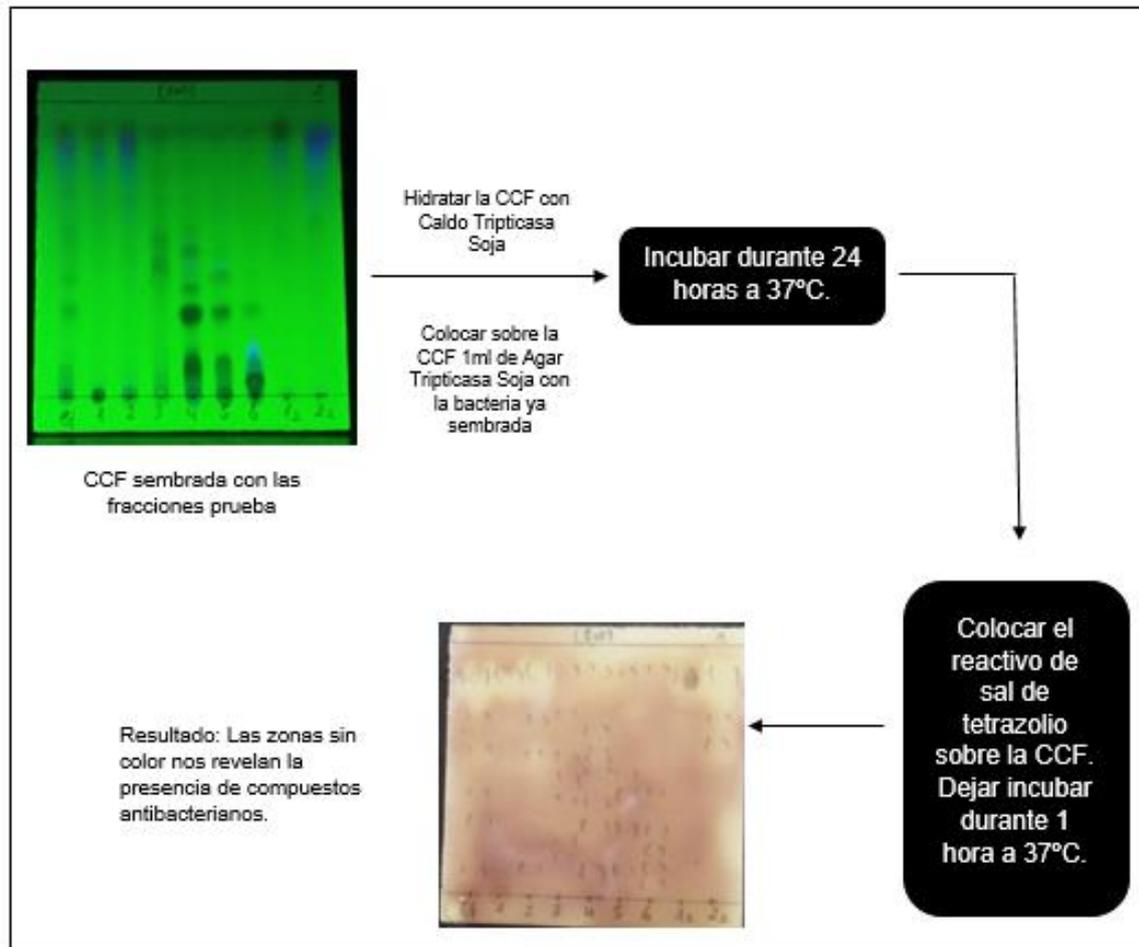


Figura 11. Esquema de Bioautografía.
Fuente. Autora.

CAPITULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Cultivo microbiano y obtención del extracto.

3.1.1. Reactivación de la cepa.

Streptomyces sp. fue cultivada en 50mL de medio A1 al 75% de agua de mar artificial, a partir del cultivo en caja Petri (**Figura 12**) o reserva criogénica mantenida a -86° C.

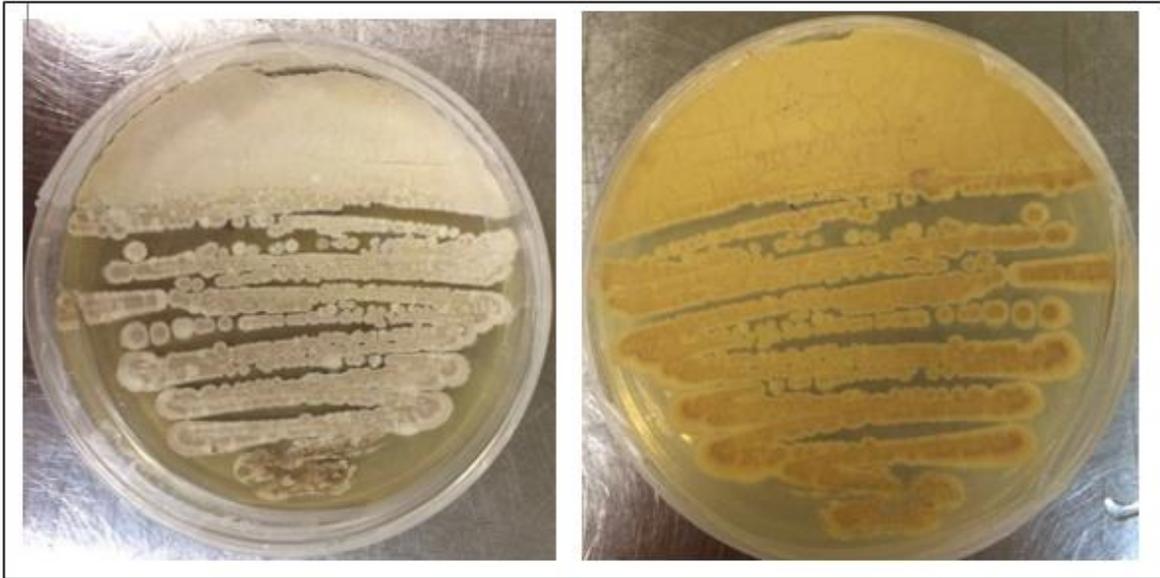


Figura 12. Cultivo en caja Petri de *Streptomyces* sp. (“MJG-05”).
Fuente. Autora.

3.1.2. Escalado del cultivo en medio A1.

Fueron sembrados aproximadamente 13L de cultivo microbiano a lo largo de la investigación, a partir del cultivo en 50mL de medio A1 al 75% de agua de mar artificial, el crecimiento en el medio líquido se dio en forma de conglomerados, el pH en todos los cultivos fue el adecuado (7,14-7,96), las variaciones de pH incrementaban la tonalidad del cultivo, y la temperatura de incubación fue de 30-32°C, condiciones similares para los actinomicetos aplicadas por García. P, *et al*, (1997). Las colonias a menudo presentan pigmentos de color debido a la biosíntesis de metabolitos secundarios que se excretan en el medio de cultivo, de acuerdo a Singleton, (2004).

Por otro lado, el olor a “tierra húmeda” (Geosmina) característica de muchos actinomicetos de origen terrestre, se percibe de manera indistinta en los actinomicetos marinos ya sea en el medio líquido o sólido. Al respecto, Zaitlin, B., Watson, S. B., Ridal, J., Satchwill, T., & Parkinson, D, (2003) considera que la producción de Geosmina es particularmente variable sobre todo en Actinomicetos de origen continental.

3.1.3. Extracción de los compuestos microbianos.

A partir de 13L de cultivo de la cepa “MJG-05” se procedió a la extracción de los compuestos con Acetato de Etilo (AcOEt) y Acetona (CH₃(CO)CH₃) en proporción 8:2, obteniéndose finalmente 1,212g de extracto final. En la **Tabla 3** se detallan los pesos en gramos luego de cada extracción. Debido a la capacidad limitada en el laboratorio para escalar a un volumen más alto de cultivo, se realizaron extracciones separadas en volúmenes inferiores (1 a 3 litros por semana). Las extracciones se monitorearon mediante cromatografía de capa fina para posteriormente unir las.

El empleo de Acetato de Etilo y Acetona permitió obtener un extracto crudo con capacidad inhibitoria de la cepa “MJG-05”, debida a la mediana polaridad del AcOEt que no altera y conserva los compuestos activos. En investigaciones similares realizadas por León, *et al*, (2007), que utilizó AcOEt como solvente único para recobrar los compuestos antibacterianos de varias cepas, demostró tener capacidad inhibitoria limitada.

En la investigación realizada por Leiva, S., Yáñez, M., Zaror, L., Rodríguez, H., & García-Quintana, H. (2004) se utilizaron cinco solventes diferentes, obteniéndose mejores resultados con Acetato de etilo y Acetona, donde la cepa estudiada tuvo un efecto inhibitorio pronunciado.

Tabla 3. Pesos en gramos (g) de las extracciones de *Streptomyces* “MJG-05”.

Pesos de las Extracciones “MJG-05” (g)					
Extracciones	Pesos del extracto	Rendimiento % (p/v)	Extracciones	Peso del extracto	Rendimiento % (p/v)
E1 (1L)	0,1757	0,018	E3 (1L)	0,0501	0,005
E2 (1L)	0,0602	0,006	E4 (1L)	0,0011	0,0001
TOTAL FRASCO 1: 0,2359g			E5 (1L)	0,0706	0,0070
			E6 (2L)	0,1442	0,0072
			E7 (2L)	0,1676	0,0084
			E8 (1L)	0,0857	0,0085
			E9 (3L)	0,4568	0,0152
			TOTAL FRASCO 2: 0,9761g		
PESO TOTAL DEL EXTRACTO: 1,212g					

Fuente. Autora.

3.2. Cromatografía en Gel de Sephadex® LH-20.

3.2.1. Primer fraccionamiento (Fraccionamiento del extracto crudo).

En la primera columna se diluyó 1 gramo del extracto final en una mezcla CHCl_3 :MeOH (1:1). Se centrifugó para separar residuos insolubles y el sobrenadante fue sembrado en gel de Sephadex® LH-20 para ser separado en el mismo. La columna se eluyó con la misma mezcla de disolventes, obteniéndose 30 fracciones (F1-F30) de aproximadamente 10mL en tubos de 25mL. La columna finalmente se lavó con metanol al 100%, recogiendo la Fracción 31 (F31). La separación y visualización de los productos se realizó mediante CCF directa en CHCl_3 :MeOH (9:1), visualizadas en luz UV (254 y 365nm) y reveladas con Óleum.

Se reunieron las fracciones de acuerdo al comportamiento cromatográfico, obteniéndose seis subfracciones (F1-F6) (**Figura 13**).

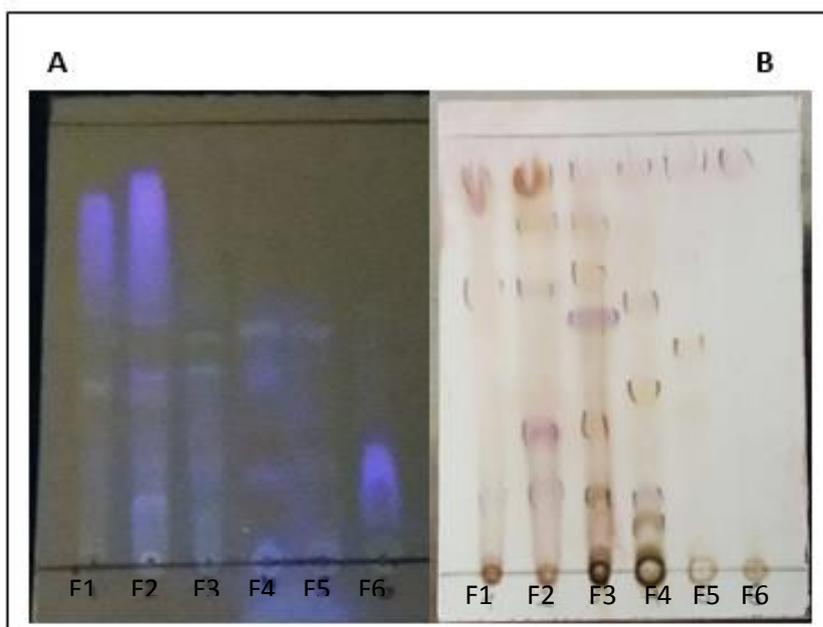


Figura 13. CCF en CHCl_3 :MeOH (9:1), de la reunión de fracciones del extracto crudo de “MJG-05”. A) UV 365nm. B) CCF revelada con Óleum.

Fuente. Autora.

En la **Tabla 4** se describen los pesos de las fracciones obtenidas de la unión.

Tabla 4. Fraccionamiento cromatográfico del extracto final y los pesos totales. **Fracción F2 con mayor peso total.**

	Fracciones colectadas	Peso vacío (g)	Peso seco (g)	Total
F1	0-3	8,3598	8,4447	0,0849
F2	4-6	8,3153	8,9951	0,6798
F3	7-9	8,4459	8,5917	0,1458
F4	10-12	8,4095	8,4396	0,0301
F5	13-14	8,3257	8,3296	0,0038
F6	15-31	18,4215	18,4401	0,0186
			TOTAL	

Fuente. Autora.

3.2.2. Segundo Fraccionamiento (Fracción F2).

Debido a que la Fracción F2 tuvo un peso mayor en comparación con las demás fracciones y la actividad biológica (descrita en el apartado 3.3.1) frente a los patógenos *S. aureus* y *E. faecalis* fue satisfactoria, fue seleccionada para realizar un segundo fraccionamiento empleando una mezcla de Hex:CHCl₃:MeOH (2:1:1), permitiendo de esta manera una mayor compactación del gel de Sephadex® LH-20 y diferencias de polaridad al incluir el Hexano como solvente. Se recogieron 40 fracciones (F1-F40) de aproximadamente 5mL, la columna se lavó con metanol al 100%, obteniéndose la Fracción 41 (F41). Las fracciones se monitorearon mediante CCF directa en CHCl₃:MeOH (9:1), visualizadas en luz UV (254 y 365nm) y reveladas con Óleum.

Se reunieron las fracciones según el comportamiento cromatográfico observado, obteniendo finalmente siete subfracciones (F2_{r1}- F2_{r7}) (**Figura 14**).

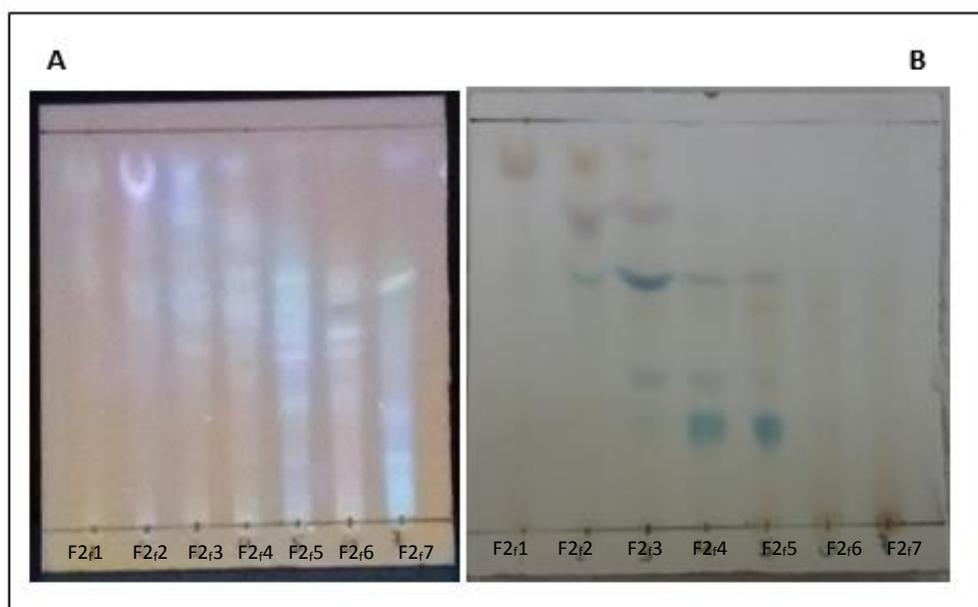


Figura 14. CCF en $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (9:1), de la reunión de subfracciones de la corrida cromatográfica en Sephadex® LH-20 de la **Fracción F2** A) UV 365nm. B) CCF revelada con Óleum.
Fuente. Autora.

En la **Tabla 5** se describen los pesos de las fracciones obtenidas de la unión del fraccionamiento.

Tabla 5. Fraccionamiento cromatográfico de la Fracción F2 y los pesos totales.

Nombre	Fracciones colectadas	Peso vacío (g)	Peso seco (g)	Total
F2,1	0-1	8,3748	8,3968	0,022
F2,2	2-3	8,2887	8,6667	0,378
F2,3	4-6	8,3498	8,4098	0,06
F2,4	7-8	8,3062	8,3356	0,0294
F2,5	9-13	8,5482	8,6007	0,0525
F2,6	14-18	8,3712	8,3830	0,0118
F2,7	19-41	8,4044	8,4337	0,0293

Fuente. Autora.

3.3. Actividad antimicrobiana.

3.3.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

La actividad de las fracciones producto del fraccionamiento del extracto crudo y las subfracciones resultantes del fraccionamiento de la fracción F2, se analizaron por el método de microdilución en caldo, contra las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*. Las fracciones obtenidas de la reunión de dos fraccionamientos fueron diluidas con

dimetil sulfóxido (DMSO), que es un compuesto que posee propiedades de ser un gran disolvente (Campos, J. M. C., Arceo, J. L. M., & Saavedra, F. A. L., 2013).

Se considera que los extractos que poseen CMI menor a 75,0 µg/ml tienen una ALTA actividad antibacteriana; de 75,0 a 150,0 µg/ml poseen actividad antibacteriana MODERADA; a partir de 150,0 a 250,0 µg/ml se considerada DÉBIL actividad antibacteriana; y más de 250,0 µg/ml, el extracto se considera INACTIVO (Mendes, M., 2007).

Se usó una concentración de 20mg/mL de cada fracción para obtener diluciones desde 1000µg/ml hasta 7,8µg/ml en la placa de 96 pocillos, al finalizar el proceso. Se empleó tetraciclina (5mg/mL) como control positivo.

Los resultados obtenidos al medir la sensibilidad de las fracciones de extracto crudo frente a *S. aureus* y *E. faecalis* se describen en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Actividad inhibitoria de las Fracciones del Extracto crudo.

No. Fracción	Actividad antibacteriana <i>Staphylococcus aureus</i>			Actividad antibacteriana <i>Enterococcus faecalis</i>		
	Pocillos	CMI (µg/ml)	ATB (µg/ml)	Pocillos	CMI (µg/ml)	ATB (µg/ml)
F1	E	62,5	1,95	G	15,625	7,8
F2	E	62,5		G	15,625	
F3	B	500		C	250	
F4	-	-		-	-	
F5	-	-		-	-	
F6	A	1000		-	-	

Fuente. Autora.

Para las subfracciones de la Fracción F2, se usó una concentración de 5mg/mL y se obtuvieron diluciones desde 250µg/ml hasta 1,95µg/ml. Los resultados de sensibilidad se detallan en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Actividad Inhibitoria de las subfracciones de la Fracción 2 (F2) del extracto crudo.

No. Fracción	Actividad antibacteriana <i>Staphylococcus aureus</i>			Actividad antibacteriana <i>Enterococcus faecalis</i>		
	Pocillos	CMI (µg/ml)	ATB (µg/ml)	Pocillos	CMI (µg/ml)	ATB (µg/ml)
F2 ₁	D	31,25	1,95	E	15,6	7,8
F2 ₂	E	15,6		E	15,6	
F2 ₃	D	31,25		E	15,6	
F2 ₄	-	-		-	-	
F2 ₅	A	250		A	250	
F2 ₆	-	-		-	-	
F2 ₇	E	15,6		B	125	

Fuente. Autora.

En los resultados de la **Tabla 6**, las fracciones F1 y F2 del extracto crudo presentan la actividad más alta frente a *S. aureus* y *E. faecalis*, siendo los valores de 62,5 y 15,625 µg/ml, respectivamente para cada microorganismo patógeno. La fracción F3 presentó un valor de CMI de 500 µg/ml para *S. aureus*, considerándose inactivo; y para *E. faecalis* presentó actividad antibacteriana débil, siendo su valor de CMI de 250 µg/ml. Las fracciones F4, F5 y F6 no presentaron actividad inhibitoria frente a ninguno de los dos patógenos.

Debido a esta actividad inhibitoria prometedor y al peso de la fracción F2 se realizó un segundo fraccionamiento para ejecutar con las subfracciones obtenidas una segunda actividad biológica. La fracción F1 también tuvo actividad inhibitoria satisfactoria, pero debido a su bajo peso no se pudo realizar otro fraccionamiento.

Los resultados de las subfracciones de la Fracción F2 del extracto crudo (**Tabla 7**), mostraron que la actividad inhibitoria más alta para *S. aureus*, se registró en la subfracciones F2₁, F2₂, F2₃ y F2₇, siendo sus valores de 31,25; 15,6; 31,25 y 15,6 µg/ml, respectivamente. La actividad inhibitoria alta para *E. faecalis*, se registró en las subfracciones F2₁, F2₂ y F2₃, siendo el valor de CMI igual para las tres subfracciones (15,6 µg/ml), la subfracción 5 obtuvo un CMI de 250 µg/ml siendo esta una actividad inhibitoria débil, la subfracción F2₇ registró una actividad moderada frente al patógeno siendo su valor de CMI de 125 µg/ml. Las subfracciones F2₄ y F2₆ fueron inactivas tanto para *S. aureus* como para *E. faecalis*.

Se obtuvieron resultados similares en la investigación realizada por León, J., *et al*, (2007). Del total de 62 *Actinomycetes* marinos evaluados, 31 cepas (50%) mostraron actividad antibacteriana frente al patógeno multirresistente *Staphylococcus aureus*. Donde las cepas de *Actinomycetes* marinos signadas como M10-77 e I-400A identificadas respectivamente como *Streptomyces* y *Thermoactinomyces* fueron las que exhibieron mayor actividad inhibitoria frente a *S. aureus*.

Se destaca la efectividad de los *Actinomycetes* aislados demostrada por las pruebas de antagonismo *in vitro* frente a *S. aureus*, patógeno aislado de aspirado de catéter y declarado multidrogorresistente a 8 drogas de un total de 10 de uso convencional en el tratamiento de bacterias Gram positivas. Estos resultados son prometedores si se considera que la aparición de cepas *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes (MRSA: cepa de la bacteria *S. aureus* resistente a varios antibióticos) son cada vez más frecuentes en todo el mundo (León, J., *et al*, 2007). Varios casos de la presencia de MRSA, han sido registrados en reportes de Perú, entre ellos los trabajos de Mendoza Ticona, C. A., Velasquez Talavera, R., Mercado Diaz, L., Ballon Echegaray, J., & Maguiña Vargas, C (2003).

Durante una investigación realizada por Carlson, J. C., Li, S., Burr, D. A., & Sherman, D. H. (2009), para descubrir nuevos productos naturales derivados de actinomicetos marinos con actividad contra cepas de *Enterococcus faecalis* resistentes a la vancomicina (VRE), se aislaron a partir de sedimentos marinos una bacteria de morfología similar al *Streptomyces*, se obtuvieron resultados positivos siendo el extracto de la bacteria marina activo para este patógeno, los resultados de este experimento fueron similares al presente trabajo investigativo.

3.4. Bioautografía.

El método de Bioautografía se realizó a todas las fracciones y subfracciones obtenidas de los dos fraccionamientos en columna de Sephadex® LH-20. Previo al método se realizó una separación de los compuestos presentes en las fracciones obtenidas mediante CCF, para ello se usó 1mg de cada fracción y se diluyó con 100µl de una mezcla CHCl₃:MeOH (1:1). Alícuotas de 5, 2 y 1µl fueron sembradas por cada fracción y se eluyeron con la mezcla CHCl₃:MeOH (9:1). Finalmente se visualizaron en luz UV 254 y 365nm (**Figura 15**).

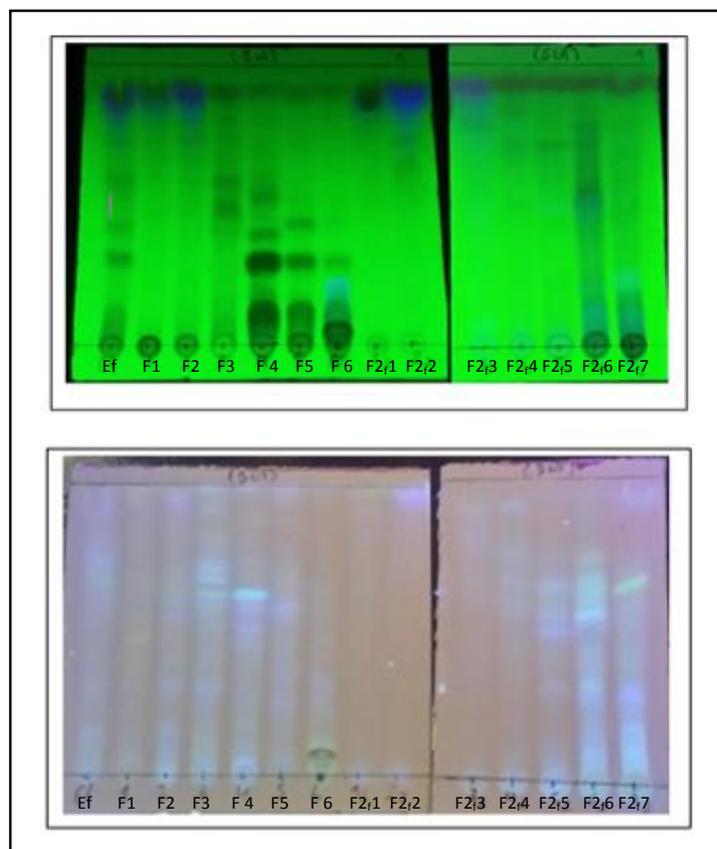


Figura 15. CCF en $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (9:1), de la reunión de fracciones de la corrida cromatográfica en Sephadex® LH-20 del **Extracto final** y la **Fracción 2**. Arriba) UV 254nm. Abajo) UV 365nm.
Fuente. Autora.

Una placa cromatográfica fue corrida y revelada con Óleum para visualizar los compuestos **(Figura 16)**.

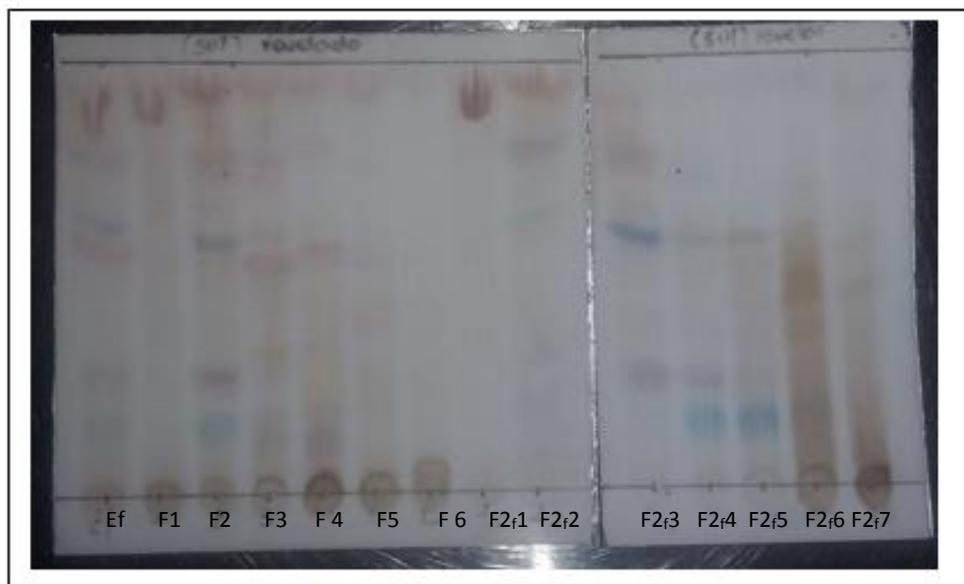


Figura 16. CCF en $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (9:1) del extracto crudo y las fracciones del primer y segundo fraccionamiento. (CCF revelada con Óleum).

Fuente. Autora.

La técnica de bioautografía fue ejecutada para la detección de la actividad antibacteriana de todas las fracciones obtenidas de los dos fraccionamientos, por cromatografía en gel de Sephadex® LH-20. La cepa bacteriana ensayada fue *Staphylococcus aureus*. Los análisis fueron realizados cualitativamente, en función de las zonas no coloreadas que indican la inhibición de crecimiento bacteriano alrededor de los compuestos separados por CCF.

En la investigación realizada por Troncoso, N., Saavedra, R., Olivares, A., Farías, J., San-Martín, S., Urrutia, H., & Agurto, C (2015), para identificar los compuestos antibacterianos en macroalgas, se estableció que la separación por CCF de los compuestos presentes en los extractos crudos elimina los efectos antagonistas de los compuestos inactivos presentes en la mezcla, por lo tanto la bioautografía fue el método más adecuado para determinar la actividad antibacteriana.

Para reconocer en la técnica Bioautográfica cuál es el compuesto del extracto de *Streptomyces* sp., que presentó actividad inhibitoria frente *Staphylococcus aureus*, fue necesario señalar en la placa de CCF, todos los compuestos que se revelaron bajo luz UV 254 y 365nm, con el fin de poder calcular el Factor de Retardo (R_F). La actividad inhibitoria se manifiesta como ausencia de color sobre un fondo violeta, debido a que no se produce la reducción de la sal de tetrazolio por ausencia de crecimiento microbiano, tal y como se evidencia en las **Figuras 17 y 18**.

El extracto crudo junto con sus fracciones F1 y F2 (Fraccionamiento 1), y las subfracciones F2:1, F2:2 y F2:3 (Fraccionamiento 2) mostraron un halo de inhibición en la zona del

compuesto (C1) con un R_F de 0,90cm. En la subfracción F2f7 se observaron 4 halos de inhibición (C2, C3, C4 y C5) con valores de R_F de 0,12; 0,26; 0,33 y 0,38 respectivamente.

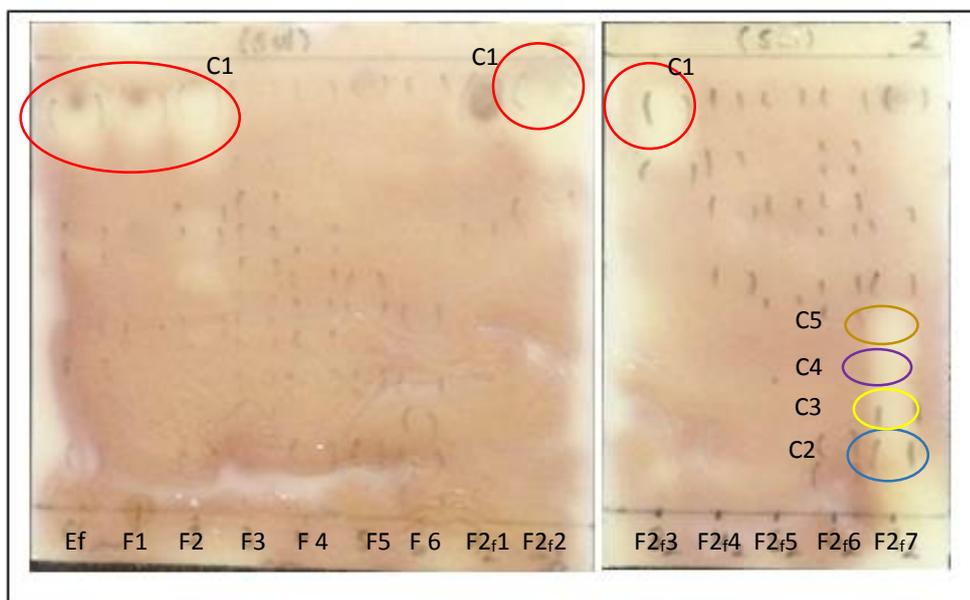


Figura 17. Resultados de Bioautografía (5µl). Compuesto **C1** con R_F 0,90cm. Compuesto **C2** con R_F 0,12cm. Compuesto **C3** con R_F 0,26cm. Compuesto **C4** con R_F 0,33cm. Compuesto **C5** con R_F 0,38cm. **Fuente.** Autora.



Figura 18. Resultados de Bioautografía (1µl). Compuesto **C1** con R_F 0,90cm. Compuesto **C2** con R_F 0,12cm. Compuesto **C3** con R_F 0,26cm. **Fuente.** Autora.

Las zonas de inhibición se corresponden con un determinado compuesto con un factor de retardo específico; los cálculos se presentan en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Cálculos del Factor de Retardo (R_F) de los compuestos activos.

Cálculos del Factor de Retardo (R_F) de los compuestos activos			
Fórmula para determinar R_F	Valor de Fase móvil (FM)	Mediciones de los compuestos activos (cm)	Resultados (cm)
$R_F = \frac{d_R}{d_{FM}}$ <p><i>d_R: distancia recorrida por el soluto</i> <i>d_{FM}: distancia recorrida por la fase móvil</i></p>	4,2 cm	C1:3,8	0,90
		C2:0,5	0,12
		C3:1,1	0,26
		C4:1,4	0,33
		C5:1,6	0,38

Fuente. Autora.

Los resultados revelan que existen diferencias en tamaño entre los halos de inhibición en las diferentes placas CCF, lo cual es dependiente de las distintas dosis que fueron sembradas de las fracciones y subfracciones.

Finalmente, la técnica bioautográfica resultó ser sencilla y rápida para detectar la actividad inhibitoria de cualquier extracto frente a un microorganismo de prueba, ya que combina las ventajas del ensayo de halos de inhibición en placa con una CCF, el extracto posteriormente podría ser purificado para caracterizar e identificar compuestos (Troncoso, N., *et al.* 2015).

CONCLUSIONES

- La cromatografía en gel de Sephadex® LH-20, permitió una separación de los compuestos presentes en el *Streptomyces* “MJG-05”, de manera bastante eficiente, ya que para el proceso bioautográfico, se pudo obtener zonas bien diferenciadas o una separación de compuestos bien marcada para la CCF.
- La fracción F1 y F2 del Extracto total, presentó la actividad inhibitoria más importante frente a *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, con una CMI de 62,5 µg/ml y 15,625 µg/ml, respectivamente, de tal manera que a partir de estos resultados se podrían realizar procedimientos cromatográficos más avanzados para detectar y aislar el compuesto responsable de la actividad.
- Debido a que la Fracción 2 del Extracto crudo presentó importante actividad biológica y su peso total era mayor, se realizó un segundo fraccionamiento en cromatografía en gel de Sephadex® LH-20, presentando la subfracción F2;2 de este fraccionamiento la actividad inhibitoria (CMI 15,6 µg/ml) más importante tanto para *Staphylococcus aureus* como para *Enterococcus faecalis*.
- La Bioautografía, es una técnica sencilla que nos permitió evaluar las manchas con actividad inhibitoria que presentaron las distintas fracciones y subfracciones. En total se evidenciaron 5 manchas (zonas de inhibición: C1, C2, C3, C4 y C5), los mismos que se pueden observar debido a la ausencia de coloración sobre un fondo violeta; esta ausencia de color se manifiesta debido a que la sal de tetrazolio no se reduce porque no existe crecimiento bacteriano en la zona.
- En la bioautografía, se utilizan reactivos de detección de actividad deshidrogenasa; la sal de tetrazolio es la más común. Como resultado, la deshidrogenasa del microorganismo prueba, (en este caso *Staphylococcus aureus*) si este se encuentra activo será convertida en sal de tetrazolio intensamente coloreada en forma de cristales violeta, esto debido a que las células vivas y metabólicamente activas son capaces de reducir la sal de tetrazolio, evidenciando de esta forma actividad metabólica, y las zonas no coloreadas nos indican la presencia de agentes antibacterianos que inhiben el crecimiento del microorganismo.

RECOMENDACIONES

- Optimizar el proceso de fermentación del cultivo con el fin de incrementar el contenido de biomasa y aumento del rendimiento.
- Profundizar en el estudio de las fracciones obtenidas que presentaron actividad biológica significativa.
- Realizar procedimientos cromatográficos más avanzados para detectar y aislar el compuesto responsable de la actividad antibacteriana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad, M. J., Bedoya, L. M., & Bermejo, P. (2011). Marine compounds and their antimicrobial activities. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, 51, 1293-1306.
- Abbott, D.Y., & Andrews, R.S. (1970). Introducción a la cromatografía. *a ed.*
- Alexander, R.R., & Griffiths, J.M (1993). Basic biochemical methods. *Wiley-Lyss (Nueva York)*
- Arenas, R. (2013). *Micología médica ilustrada* (4th ed.). México: McGraw- Hill.
- Campos, J. M. C., Arceo, J. L. M., & Saavedra, F. A. L. (2013). Efecto de aspersiones del dimetilsulfóxido en la productividad del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 785-788.
- Carlson, J. C., Li, S., Burr, D. A., & Sherman, D. H. (2009). Isolation and characterization of tirandamycins from a marine-derived *Streptomyces* sp. *Journal of natural products*, 72(11), 2076-2079.
- Choma, I. M., & Grzelak, E. M. (2011). Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218(19), 2684-2691.
- Macarulla & Marino. (1992). *Bioquímica cuantitativa* (1st ed.). España: Reverté.
- COLORADO R, J., GALEANO J, E., & MARTÍNEZ M, A. (2007). Desarrollo de la bioautografía directa como método de referencia para evaluar la actividad antimicrobiana de la gentamicina contra *Escherichia coli*. *Vitae*, 14(1), 67-71.
- Dworkin, M., & Falkow, S. (Eds.). (2006). *The Prokaryotes: Vol. 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes* (Vol.3). Springer Science & Business Media.
- Espliego, F. (1996). *Actinomicetos marinos: Aislamiento, taxonomía y producción de metabolitos con actividad antitumoral*. (1st ed.). España: Editorial Interamericana.
- Evangelista, Z. M., & Moreno, A. E. (2007). Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos. *Biotechnología*, 11, 37-50
- Freifelder, D. (1991). *Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular* (1st ed.). México: Reverté.
- Fiedler, H.P., C. Bruntner, A.T. Bull, A.C. Ward, M. Goodfellow, O. Potterat, C. Puder & G. Mihm. 2005. Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 87(1):37-42.
- García. J, Gavilanes. A, Montero. F, Oñaderra. M, Vivanco. F. (1999). Técnicas instrumentales

- de análisis en Bioquímica. (1 era ed.). España: Editorial Síntesis.
- García. P, Fernández. M, Paredes. F. (1997). Microbiología Clínica Aplicada. (3era ed.) España: Ediciones Días de Santos, S.A.
- Kelecom, A. (2002). Secondary metabolites from marine microorganisms. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 74(1), 151-170.
- Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G., & Marinelli, F. (2000). Rare genera of actinomycetes as potencial producers of a new antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 78, 399-405.
- Leiva, S., Yáñez, M., Zaror, L., Rodríguez, H., & García-Quintana, H. (2004). Actividad antimicrobiana de Actinomycetes aislados desde ambientes acuáticos del Sur de Chile. *Revista médica de Chile*, 132(2), 151-159.
- León, J., Liza, L., Soto, I., Cuadra, D., Patiño, L., & Zerpa (2007). Actinomycetes bioactivos de sedimento marino de la costa central del Perú. *Revista peruana de biología*, 14(2), 259-270.
- Leveau, J. Y. B., & M coord J-Y Leveau, M. B. (2000). *Microbiología industrial: los microorganismos de interés industrial*.
- Macarulla & Marino. (1992). *Bioquímica cuantitativa* (1st ed.). España: Reverté.
- Malbrán, C. (2001). Métodos estandarizados para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana en bacterias aisladas de animales: test de difusión por discos y test de dilución. *Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Departamento Bacteriología. Servicio Antimicrobianos. Buenos Aires, Argentina*.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., & Kim, S. K. (2013). Marine actinobacterial metabolites: Current status and future perspectives. *Microbiological Research*, 168(6), 311–332. <http://doi.org/10.1016/j.micres.2013.02.002>
- Mendoza Ticona, C. A., Velasquez Talavera, R., Mercado Diaz, L., Ballon Echegaray, J., & Maguiña Vargas, C. (2003). Susceptibilidad antimicrobiana de Staphylococcus aureus sensible, con sensibilidad " BORDERLINE" y resistentes a la meticilina. *Revista Medica Herediana*, 14(4), 181-185.
- METODOLOGIAS PARA EVALUAR IN VITRO LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE COMPUESTOS DE ORIGEN VEGETAL Methodologies for evaluating the In vitro antibacterial activity of natural compounds of plant origin. (2009), (42), 263–268.
- Pietra, F. (1997). Secondary metabolites from marine microorganisms: bacteria, protozoa,

- algae and fungi. Achievements and prospects. *Nat. Prod. Rep.*, 14(5), 453-464.
- Ruiz, J. D., Ramírez, N. F., & Arroyave, O. (2001). Determinación de concentraciones inhibitorias mínimas a algunos antibióticos de las bacterias aisladas de glándula mamaria bovina en San Pedro de los Milagros , Antioquia ., 14(20), 143–154.
- Taddei, A., Rodríguez, M. J., Márquez-Vilchez, E., & Castelli, C. (2006). Isolation and identification of *Streptomyces* spp. from Venezuelan soils: Morphological and biochemical studies. I. *Microbiological Research*, 161(3), 222–231. <http://doi.org/10.1016/j.micres.2005.08.004>
- Tan, S. P., O’Sullivan, L., Prieto, M. L., Gardiner, G. E., Lawlor, P. G., Leonard, F., ... & Hughes, H. (2012). Extraction and bioautographic-guided separation of antibacterial compounds from *Ulva lactuca*. *Journal of applied phycology*, 24(3), 513-523.
- Thompson, L. & Troeh, F. (2002). *Los suelos y su fertilidad* (4th ed.). España: Reverté.
- Troncoso, N., Saavedra, R., Olivares, A., Farías, J., San-Martín, S., Urrutia, H., & Agurto, C. (2015). Identificación de compuestos antibacterianos en macroalgas presentes en la Región del Biobío, Chile. *Revista de biología marina y oceanografía*, 50, 199-204.
- Zaitlin, B., Watson, S. B., Ridal, J., Satchwill, T., & Parkinson, D. (2003). Actinomycetes in Lake Ontario: habitats and geosmin and MIB production. *American Water Works Association. Journal*, 95(2), 113.

ANEXOS

ANEXO 1. MEDIOS DE CULTIVO PARA ACTINOMICETOS SUPLEMENTADOS AL 75% CON AGUA DE MAR ARTIFICIAL.

A. Fórmula para preparar 10L de Agua de Mar artificial.	
Solución 1 (disolver en 8L)	
NaCl	211,90g
Na ₂ SO ₄	35,5g
KCl	5,99g
NaHCO ₃	1,74g
KBr	0,863g
Ácido Bórico	0,230g
NaF	0,028g
Solución 2 (disolver en 1,93L)	
MgCl ₂	95,92g
CaCl ₂	13,44g
SrCl ₂	0,218g
Nutriente 1 (añadir 10ml de solución stock)	
NaNO ₃	46,70g en 1L de H ₂ O
Nutriente 2 (añadir 10ml de solución stock)	
NaH ₂ PO ₄	0,3g en 1L de H ₂ O
Solución Metal stock 1-Hierro (añadir 10ml de solución stock)	
FeCl ₃ . 6H ₂ O	1,77g en 1L de H ₂ O
Na ₂ EDTA. 2H ₂ O	3,09g
Solución Metal stock 2- Metales trazas (añadir 10ml de la solución stock)	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,073g en 1L de H ₂ O
CaSO ₄ .7H ₂ O	0,016g
MnSO ₄ .2H ₂ O	0,54g
Na ₂ MO ₄ .2H ₂ O	1,48mg
Na ₂ SeO ₄	0,173mg
NaCl. 6H ₂ O	1,49mg
Na ₂ EDTA. 2H ₂ O	2,44g
Stock de Vitaminas (añadir 10ml de la solución stock)	
Tiamina Clorhidrato	0,01g en 1L de H ₂ O
Biotina	2mg
Vitamina B12	1mg

B. MEDIO A1 (1L de disolución)	
Almidón	10g
Extracto de levadura	4g
Peptona	2g
Carbonato de Calcio	1g
Agua de mar	75%
Agua destilada	25%
Suplementos	
KBr	5ml/L
Fe(SO ₄) ₃	5ml/L
Para placas de agar añadir: Agar Bacto 15g	

Fuente. Departamento de Química- Sección Bioensayos.