



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Aislamiento y actividad biológica de metabolitos secundarios de una
actinobacteria marina (Actinomycetales)

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTOR: Aguirre Cobos Génesis Xamara

DIRECTOR: Cartuche Flores Luis Emilio, Bq.

LOJA – ECUADOR

2013

CERTIFICACIÓN

Bq.

Luis Emilio Cartuche Flores

DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

Bq.

Darío Javier Cruz Sarmiento

CO-DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

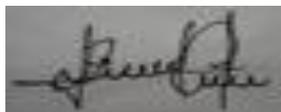
CERTIFICAN:

Que el presente trabajo, denominado: **“Aislamiento y actividad biológica de metabolitos secundarios aislados de una actinobacteria marina (Actinomycetales)”** realizado por Génesis Xamara Aguirre Cobos, cumple con los requisitos establecidos en las normas generales para la Graduación en la Universidad Técnica Particular de Loja, tanto en el aspecto de forma como de contenido, por lo cual me permito autorizar su presentación para los fines pertinentes.

Loja, 20 de septiembre de 2013



f).....



f).....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo. GÉNESIS XAMARA AGUIRRE COBOS declaro ser autora del presente trabajo de fin de titulación: **Aislamiento y actividad biológica de metabolitos secundarios aislados de una actinobacteria marina (Actinomycetales)**, de la titulación 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 procedentes y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 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 que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad"



f).
Génesis Xamara Aguirre Cobos
Cédula 1105039067

DEDICATORIA

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor. Por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Mi madre Mireya por ser el pilar fundamental de mi vida, por ayudarme en todo momento, por creer en mí, sus consejos, sus valores, la motivación constante para alcanzar mis metas y sobre todo su amor y a mi padre Carlos que desde el cielo guía mis pasos.

A mis familiares por brindarme el apoyo que siempre he necesitado, sus sabias palabras y consejos que han hecho de mi una mejor persona y sobre todo su motivación para este largo camino.

Bq. Luis Cartuche por su gran apoyo en todo momento y motivación para la culminación de mis estudios profesionales y para la elaboración de esta tesis, por su tiempo compartido y por impulsar el desarrollo de mi formación profesional.

A mis amigos Gina, Paola, Daniela, Andrés, Estefanía y Marco por ser los mejores amigos que he conocido en esta etapa estudiantil, por haberme permitido compartir con ellos y por su apoyo en los buenos y malos momentos.

AGRADECIMIENTO

En el presente trabajo de tesis agradezco a Dios primeramente por bendecirme y haberme permitido cumplir mis metas en la vida,

A mi madre por ser mi apoyo incondicional en todo momento, a mi director de Tesis Bq. Luis Cartuche por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación ha logrado en mí que pueda terminar mis estudios con éxito, su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable no solamente en el desarrollo de esta tesis sino en mi formación como profesional.

A mi Co-Director del trabajo Bq. Darío Cruz por toda la ayuda prestada en el desarrollo de mi tesis, por sus conocimientos brindados y su paciencia para el desarrollo de este trabajo.

A mis amigos por haber compartido conmigo estos cinco años y haberme permitido formar parte de sus vidas.

ÍNDICE DE CONTENIDO

PORTADA	I
CERTIFICACIÓN	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTO.....	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
RESUMEN EJECUTIVO	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO	5
1.1. Los Actinomicetos	6
1.1.1. Características generales.....	6
1.1.2. Condiciones de crecimiento	7
1.1.3. Productos naturales obtenidos de actinomicetos con utilidad clínica.....	8
1.2. Métodos de clasificación taxonómica	10
1.2.1. Quimiotaxonomía.....	10
1.2.2. Identificación molecular de bacterias mediante aislamiento de ADNr	13
1.3. Métodos de aislamiento e identificación de metabolitos secundarios.....	16
1.3.1. Cromatografía	16
1.3.2. Cromatografía de adsorción	16
1.3.3. Cromatografía en gel de sílice	16
1.3.4. Cromatografía en capa fina	17
1.3.5. Cromatografía de gases-Espectroscopía de masas	17
1.3.6. Resonancia magnética nuclear de protón	18

1.4. El fenómeno de la resistencia microbiana	19
---	----

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS	21
2.1. Reactivación de la cepa bacteriana MJG-7	22
2.2. Identificación morfológica de la cepa bacteriana MJG-7	22
2.3. Aislamiento de ADN; PCR; secuenciación y análisis filogenético	22
2.4. Cultivo y obtención de extracto de la cepa MJG-7	23
2.4.1. Cultivo	23
2.4.2. Obtención de extracto	23
2.4.3. Fraccionamiento en columna en gel de sílice	24
2.5. Cromatografía de gases-Espectroscopía de masas	24
2.6. Resonancia magnética nuclear de protón	25
2.7. Método de microdilución en caldo	26
2.7.1. Cultivo overnight	26
2.7.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	26

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
3.1. Morfología de la cepa MJG-7	28
3.2. Identificación molecular mediante análisis de ADNr 16S	28
3.3. Obtención de extracto y fraccionamiento	30
3.3.1. Extracto en Acetato de Etilo	30
3.3.2. Cromatografía en Columna en gel de sílice	30
3.4. Identificación por Cromatografía de gases-Espectroscopía de masas	32
3.5. Resonancia magnética nuclear	33
3.5.1. Análisis de composición de las fracciones Gx-1 a la Gx-9	33
3.6. Actividad antimicrobiana del extracto MJG-7	39

CONCLUSIONES	41
---------------------------	-----------

RECOMENDACIONES	43
------------------------------	-----------

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
ANEXOS.....	49
ANEXO 1. MEDIOS DE CULTIVO PARA ACTINOMICETOS SUPLEMENTADOS CON AGUA DE MAR ARTIFICIAL	50
ANEXO 2. SECUENCIA DE LA CEPA MJG-7 ASILADA MEDIANTE ANÁLISIS DE ADNr 16S	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Géneros de Actinomycetales productores de metabolitos microbianos bioactivos	9
Tabla 2. Clasificación Quimiotaxonómica de los Actinomicetos	11
Tabla 3. Tipos de paredes celulares de los actinomicetos	13
Tabla 4. Características del extracto crudo MJG-7	30
Tabla 5. Fraccionamiento del extracto MJG-7.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Relación filogenética de la Clase Actinobacteria basada en el análisis de la región ADNr/ARNr 16S.....	6
Figura 2. Morfología bacteriana del género <i>Streptomyces</i> en cultivo en placa	8
Figura 3. Filogenia del Dominio bacteria basada en el análisis de la región ADNr 16S	14
Figura 4. Etapas a seguir en el proceso de identificación	15
Figura 5. Valores de desplazamiento químico de protones.	19
Figura 6. a y b. Morfología de la cepa MJG-7 en cultivo en placa;	28
Figura 7. Hipótesis filogenética para 16S parcial inferida mediante Neighbor joining y Maximun Likelihood. Valores superiores de bootstrap al 50% de NJ y ML están representados sobre los clados. <i>Streptosporangium roseum</i> NR 074558 es presentado como grupo externo.....	29
Figura 8. Cromatograma de la fracción (3 y 4) donde se muestran los tiempos de retención de cada compuesto.....	32
Figura 9. Espectro de Resonancia de Protón (400 MHz), de las fracciones 3-4 en Cloroformo-d	34
Figura 10. Espectro de Resonancia de Protón (400 MHz), de las fracciones 5-6 en Cloroformo-d	35
Figura 11. Espectro de Resonancia de Protón (400 MHz), de la fracción 9 en Cloroformo-d.....	36
Figura 12. Espectro de Resonancia de Protón (400 MHz), de las fracciones 5 y 6, en Cloroformo-d	37
Figura 13. Espectro de Resonancia de Protón (400 MHz), de la fracción 25, en Cloroformo-d	38
Figura 14. Espectro de Resonancia de Protón (400 MHz), de las fracciones 53 a 86,.....	39

RESUMEN EJECUTIVO

Los actinomicetos marinos poseen capacidades metabólicas y fisiológicas diferentes a sus similares terrestres brindando la posibilidad de encontrar nuevas entidades químicas con extensos potenciales farmacológicos. Se seleccionó la cepa bacteriana MJG-7 para su caracterización morfológica y molecular, extracción de metabolitos secundarios y evaluación de su actividad antimicrobiana. El análisis de la región parcial ADNr 16S reveló que la cepa MJG-7 pertenece al género *Streptomyces*. Se obtuvo un total de 2,07 g de extracto por 10 litros de cultivo el cual se fraccionó por cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice (CC), obteniéndose un total de 146 fracciones. No se logró purificar compuestos, pero a través del análisis de CG/EM se identificó la presencia de dos compuestos en las fracciones tres y cuatro, identificados como Parasiticol y Bis (2-etilhexil) ftalato. A través del método de microdilución en caldo se demostró que el extracto crudo presentó actividad inhibitoria con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 500 µg/mL frente a *Enterococcus faecalis* (Ef), *Trichophyton mentagrophytes* (Tm) y *Trichophyton rubrum* (Tr). Ninguna de las fracciones obtenidas resulto activa.

Palabras Clave: Actinomicetos marinos, Parasiticol, Bis (2-etilhexil) ftalato, ADNr 16S, CMI, *Streptomyces*

ABSTRACT

Marine actinomycetes have both metabolic and physiological capabilities different to their similar terrestrial, offering the possibility of finding new chemical entities with extensive pharmacological potentials. Bacterial strain MJG-7 was selected for morphological and molecular characterization, extraction of secondary metabolites and evaluation of their antimicrobial activity. Analysis of rDNA 16-S-7 partial region revealed that MJG-7G strain belongs to the genus *Streptomyces*. A total of 2.07 g extract per 10 liters of culture were obtained, which was fractionated by open column chromatography over silica gel (CC), yielding a total of 146 fractions. It was not possible to purify compounds, but by analyzing GC/MS the presence of two compounds in fractions three and four were identified as Parasiticol and Bis (2-ethylhexyl) phthalate. Broth microdilution method allows the demonstration of the inhibitory activity of the crude extract with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 500 ug/mL against *Enterococcus faecalis* (*Ef*), *Trichophyton mentagrophytes* (*Tm*) and *Trichophyton rubrum* (*Tr*). None of the fractions obtained were active.

Keywords: Parasiticol, Bis (2-ethylhexyl) phthalate, 16S rDNA, CMI, *Streptomyces*

INTRODUCCIÓN

El fácil acceso y el uso inapropiado de fármacos para combatir las infecciones causadas por microorganismos patógenos han facilitado la selección persistencia y diseminación de microorganismos resistentes. (Leiva et al, 2004). El incremento vertiginoso de patógenos fármaco-resistentes limita cada vez más la eficacia de los antimicrobianos (Demain et al., 2009), motivando así la búsqueda de nuevas fuentes de entidades químicas para combatir las enfermedades microbianas (Donadio et al., 2010; León et al., 2007)

Hasta el año 2002 se han reportado más de 22 000 productos naturales de origen microbiano. Los actinomicetos aportan con 10 100 compuestos, siendo el género *Streptomyces* los más prolíficos con 7600 compuestos descritos hasta la fecha, mientras que los denominados actinomicetos raros presentan 2500 compuestos; los hongos 8600 y las bacterias diferentes de esta clase 3800 compuestos. (Bérdy, 2005; Praveen et al., 2009).

Las bacterias del orden Actinomycetales son abundantes en los suelos pero también pueden ser encontradas en ambientes acuáticos dulceacuólicas y marinos (Leiva et al., 2004). Los sedimentos marinos como fuente de actinomicetos bioactivos han sido uno de los recursos menos explorados hasta hace poco, pero hoy en día constituyen una de las fuentes más promisorias de obtención de los mismos. (Fenical et al., 2006). Debido a que los ecosistemas acuáticos difieren notablemente de los terrestres, las capacidades metabólicas y fisiológicas de los actinomicetos marinos son también diferentes (León et al., 2007).

Por tanto, la búsqueda de metabolitos bioactivos se ha centrado en la recolección y estudio de especies nativas del ecosistema marino que brindan la posibilidad de encontrar entidades químicas estructuralmente nuevas cuyo potencial de aplicación farmacológico es diverso.

Hasta el momento no se han encontrado reportes de estudios realizados en el Ecuador, sobre el aislamiento de metabolitos bioactivos procedentes de Actinobacterias de origen marino.

En la presente investigación se realizó un análisis morfológico y molecular de la cepa bacteriana "MJG-7", aislada de un sedimento en la Isla de Jambelí, provincia de El Oro-Ecuador. Se obtuvo un extracto mediante procesos de fermentación, extracción con Acetato de etilo y resinas de adsorción; el extracto se sometió a fraccionamiento empleando sílicagel y solventes de polaridad creciente para separar los compuestos existentes. La

determinación de la actividad antimicrobiana del extracto y de las fracciones obtenidas se la realizó por el método de Microdilución en Caldo.

CAPÍTULO 1
MARCO TEÓRICO

1.1. Los Actinomicetos

1.1.1. Características generales

Los actinomicetos son un grupo de microorganismos ampliamente distribuidos en ecosistemas naturales, abundantes en los suelos pero también encontrados en ambientes acuáticos, dulceacuícolas y marinos (Leiva et al, 2004). Presentan una actividad metabólica alta produciendo terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares hidrolíticas y lignolíticas capaces de degradar la materia orgánica de origen animal y vegetal, por lo que son miembros importantes en la descomposición del suelo (Salazar et t al, 2013), así como la producción de metabolitos bioactivos con diversas actividades biológicas, siendo los principales productores de antibióticos (Zotchev, 2012). En la figura 1 se describen las relaciones filogenéticas de la Clase Actinobacteria basadas en el análisis de la región parcial ADNr 16S.

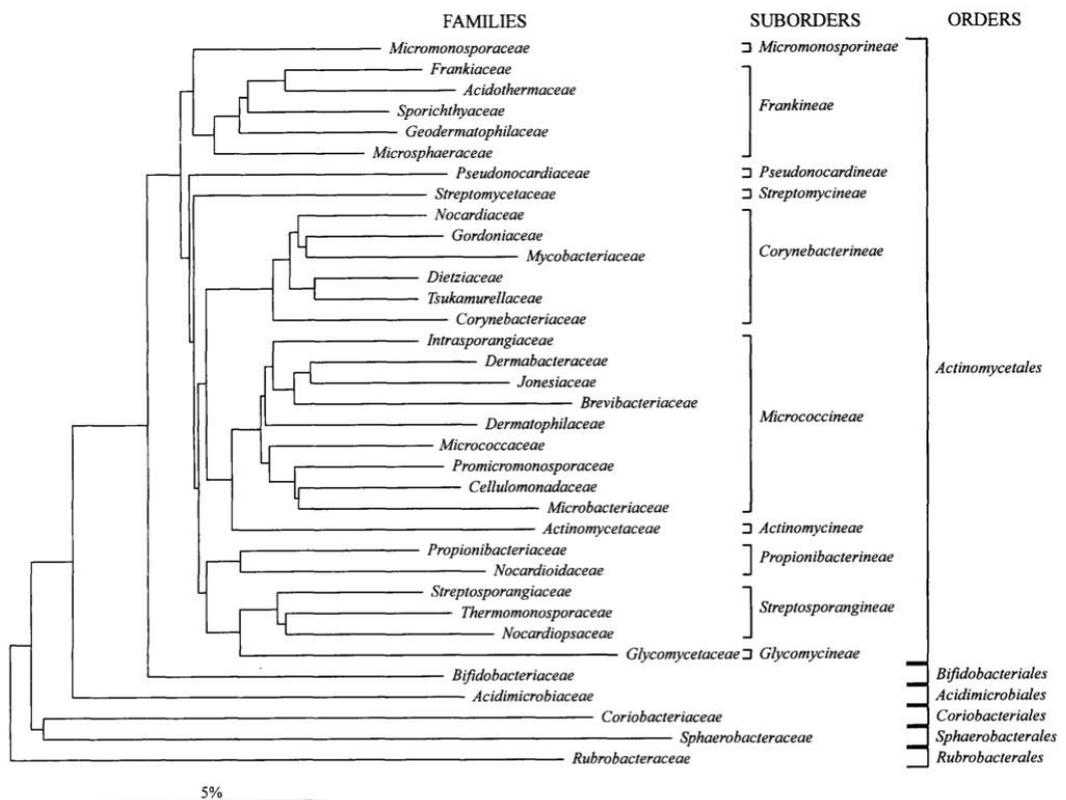


Figura 1. Relación filogenética de la Clase Actinobacteria basada en el análisis de la región ADNr/ARNr 16S

Fuente: (Stackebrandt et al, 1997)

Los actinomicetos son bacterias gram-positivas no-alcohol-ácido resistentes, no motiles, en donde predominan los filamentos con verdaderas ramificaciones que pueden ser evidentes después de 14-48 horas de cultivo (Serrano et al, 2005). Presentan en su ADN un alto contenido de Guanina y Citosina (58 a 78% G+C), su pared está compuesta de peptidoglicano y el diámetro de sus hifas es menor al de los hongos (0,5 – 2 μm) (Sylvia, 2005). Su característico olor a tierra húmeda es debido a la producción de un metabolito llamado geosmina (Zaitlin et al, 2003).

1.1.2. Condiciones de crecimiento

El pH óptimo para el crecimiento de estos microorganismos está entre 6,5 y 8; siendo ausente su crecimiento a un pH de 5. La mayoría de los actinomicetos crecen en medios como agar nutritivo, tripticasa soja, agar sangre o agar infusión cerebro corazón, sin embargo, para que puedan diferenciarse y desarrollar esporas o pigmentos es necesario la utilización de medios suplementados con quitina coloidal, extracto de suelo, avena, almidón, sales inorgánicas, extractos de levadura o peptona (Franco, 2008), o cualquier otro componente químico que imite el medio donde se desarrollan normalmente (Lu et al, 2012).

El crecimiento de las colonias en el medio sólido 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 en desarrollarse y algunas cepas de crecimiento lento se pueden tardar hasta un mes de incubación. En medios líquidos estos crecen formando “pellets” o agrupaciones filamentosas, se recomienda una agitación de 200 o 250 rpm para una mejor aireación (Franco, 2008). En la figura dos se puede observar el crecimiento típico en cultivo en placa del orden Actinomycetales.



Figura 2. Morfología bacteriana del género *Streptomyces* en cultivo en placa.¹

Fuente: ("MicrobeWorld," 2012)

1.1.3. Productos naturales obtenidos de actinomicetos con utilidad clínica

Aproximadamente se han aislado 22 500 metabolitos bioactivos a partir de microorganismos, de los cuales 10 100 pertenecen a los Actinomicetos, 8600 al reino Fungi y 3800 a las Bacterias diferentes del orden Actinomycetales. Alrededor de 14 000 metabolitos secundarios presentan actividad antimicrobiana, aproximadamente 500 tienen actividad antitumoral y aproximadamente 1500 compuestos exhiben actividad antiviral. (Bérdy, 2005)

Dentro del grupo de los actinomicetos se destaca el género *Streptomyces*, de donde se han aislado 7600 compuestos y, de los denominados Actinomicetos raros 2500 compuestos; siendo los más importantes en este grupo los géneros *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Streptoverticillium*, *Actinoplanes*, *Nocardia*, *Sacharopolyspora* y *Streptosporangium* como las más frecuentes productoras de metabolitos (tabla 1).

¹ No se especifican los medios de cultivo utilizados para su crecimiento.

Tabla 1. Géneros de Actinomycetales productores de metabolitos microbianos bioactivos

Streptomycetaceae:		Thermonosporaceae	
<i>Streptomyces</i>	~8000	<i>Actinomadura</i>	345
<i>Streptoverticillium</i>	258	<i>Saccharothriks</i>	68
<i>Kiatsatosponia</i>	37	<i>Microbiospora</i>	54
<i>Chainia</i>	30	<i>Actinosynnema</i>	51
<i>Microellobosponia</i>	11	<i>Nocardiopsis</i>	41
<i>Nocardioides</i>	9	<i>Microtetrastora/Nonomuria</i>	26/21
		<i>Thermopolyspora</i>	19
		<i>Micropolyspora/Faenia</i>	13/3
		<i>Thermoactinomyces</i>	14
		<i>Thermopolyspora</i>	1
		<i>Thermoactinopalyspora</i>	1
Micromonosporaceae:		Mycobacteriaceae	
(Actinoplanetes)		(Actinobacteria)	
<i>Micromonospora</i>	740	<i>Nocardia</i>	(357)
<i>Actinoplanes</i>	248	<i>Mycobacterium</i>	57
<i>Dactylosporangium</i>	58	<i>Arthrobacter</i>	25
<i>Ampullaniella</i>	9	<i>Brevibacterium</i>	17
<i>Glycomyces</i>	2	<i>Proactinomyces</i>	14
<i>Catenuloplanes</i>	3	<i>Rhodococcus</i>	13
<i>Catellatospora</i>	1		
Pseudonocardiaceae:		Otras especies no clasificadas:	
<i>Saccharopolyspora</i>	131	<i>Actinosporangium</i>	30
<i>Amycalotopsis/Nocardia</i>	120/357	<i>Microellobosporia</i>	11
<i>Kibdellosporangium</i>	34	<i>Frankia</i>	7
<i>Pseudonocarida</i>	27	<i>Westerd/Kella</i>	6
<i>Amycolata</i>	12	<i>Kitasatos</i>	5
<i>Saccharomonospora</i>	2	<i>Synnenomyces</i>	4
<i>Actinopolyspora</i>	1	<i>Sebekia</i>	3
		<i>Elaktomyces</i>	3
		<i>Exceslsospora</i>	3
		<i>Waksmania</i>	3
		<i>Alkalomyces</i>	1
		<i>Catellatospora</i>	1
		<i>Erythrosporangium</i>	1
		<i>Streptoplanospora</i>	1
		<i>Miroechinospora</i>	1
		<i>Salinospora</i>	1
Streptosporangiaceae:			
(Maduromycetes)			
<i>Streptosporangium</i>	79		
<i>Streptoalloteichus</i>	48		
<i>Spirillospora</i>	11		
<i>Planobispora</i>	10		
<i>Kutzneria</i>	4		
<i>Planomospora</i>			

Fuente: (Berdy, 2005)

En los actinomicetos es reconocida la capacidad de producir metabolitos bioactivos que son usados como fármacos, los más importantes son los antibióticos, estas sustancias presentan variedad de estructuras químicas como cadenas alifáticas, anillos aromáticos aislados o condensados, anillos heterocíclicos, oligopéptidos y oligosacáridos entre otros y a bajas concentraciones pueden inhibir el crecimiento de algunas bacterias (Martinez et al, 2007).

Dentro del grupo de los antibióticos encontramos aminoglucósidos como la Estreptomicina producida por *Streptomyces griseus*, la Gentamicina producida por *Micromonospora purpurea* y a los β -Lactámicos como la Teomicina producida por *Streptomyces catleya* con un amplio espectro de acción contra bacterias areobias y anaerobias, Gram-positivas y Gram-negativas incluyendo *Pseudomonas* spp. En el grupo de las Tetraciclinas encontramos la Oxitetraciclina producida por *Streptomyces rimosus*, Tetraciclina y Clortetraciclina producidas por *Streptomyces aureofaciens* y en el grupo de los macrólidos se encuentra la Eritromicina producida por *Saccharopolyspora erythrea*, siendo estos algunos ejemplos destacables con utilidad clínica en el campo de los antibacterianos (Martinez et al, 2007).

La mayoría de los antibióticos usados en quimioterapia se han aislados de algunos actinomicetos, dentro de los que se encuentran la Actinomicina D, Mitomicina C, Bleomicina, Neomicina y las Antraciclinas, Daunorrubicina y Doxorrubicina (Demain, 1999). Los productos aislados por actinomicetos también han resultado tener buena actividad inmunosupresora, tal es el caso de los policétidos, Tacrolimus (FK-506 o Fujymicin®), aislado de *Streptomyces tsukubaensis* y de la Rapamicina (Sirolimus®) aislado de *Streptomyces hygroscopicus* (Martinez et al, 2007)

1.2. Métodos de clasificación taxonómica

1.2.1. Quimiotaxonomía

La clasificación de los actinomicetos a través de la Quimiotaxonomía (tabla 2) estudia los componentes de la pared bacteriana y su variación química, el tipo de péptidoglicano presente, incluyendo los azúcares e isómeros de ácido Diaminopimélico (DAP), el patrón de los ácidos grasos y de fosfolípidos de membrana, las menaquinonas y su grado de

hidrogenación, contenido y tipo de ácidos micólicos y el porcentaje molar de la relación Guanina – Citosina (mol % G + C) del ADN (Franco, 2008).

Tabla 2. Clasificación Quimiotaxonómica de los Actinomicetos

FAMILIA	CARACTERÍSTICAS	GÉNERO
Actinomycetaceae	Filamento ramificado con fragmentos. Sin micelio aéreo. Paredes celulares variables que incluyen tipo V y VI	<i>Actinomyces</i> <i>Agromyces</i> <i>Arachnia</i> <i>Bacterionema</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Rothia</i>
Actinoplanaceae	GRUPO A Sin micelio aéreo Pared celular tipo II Zoosporas en vesícula (esporangio) Grupo B Micelio Aéreo Pared celular tipo III Esporas con motilidad o sin ella, formadas dentro de vesículas (esporangio)	<i>Actinoplana</i> <i>Ampullariella</i> <i>Dactylosporangium</i> <i>Planobispora</i> <i>Planomonospora</i> <i>Spirillospora</i> <i>Streptosporangium</i>
Dermatophilaceae	Micelio dividido en todos los planos, sin micelio aéreo. Pared celular tipo III. Forma elementos motiles (zoosporas).	<i>Dermatophilus</i> <i>Geodermatophilus</i>
Frankiaceae	Simbióticas obligadas, formando nódulos en raíces de plantas no leguminosas que pueden fijar nitrógeno.	<i>Frankia</i>
Micromonosporaceae	Únicamente micelio vegetativo. Pared celular tipo II Forma esporas individuales, sensibles al calor.	<i>Micromonospora</i>
Mycobacteriaceae	Crecen como bacilos, filamentos ramificados, ocasionalmente con micelio rudimentario. Fuertemente ácido resistente. Pared celular Tipo IV. Alto contenido en lípidos que incluye ácidos micólicos.	<i>Mycobacterium</i> <i>Mycrococcus</i>
Nocardiaceae	Micelio vegetativo que fragmenta, forma ácidos nocardiomicólicos (lípidos LCN-A). Pared celular tipo IV. Se pueden formar cadenas de esporas en el micelio vegetativo y aéreo. Micelios vegetativos no fragmentados	<i>Rhodococcus</i> <i>Micropolyspora</i> <i>Nocardia</i>

	<p>Micelio aéreo.</p> <p>Aeróbios. Pared celular tipo I. Esporas presentes en micelio aéreo, pero también pueden ser observadas en micelios vegetativos. Cadenas de artrosporas formadas dentro de una vaina. Esporas principalmente no motiles</p>	<p><i>Chainia</i> <i>Elytrosporangium</i> <i>Intrasporangium</i> <i>Kitasatoa</i> <i>Microellobisporia</i> <i>Streptoverticillium</i> <i>Streptomyces</i></p>
Thermoactinomycetaceae	<p>Micelio aéreo y vegetativo que fragmenta. Pared celular tipo III. Forman endosporas resistentes al calor. Actualmente ya no se considera dentro de los Actinomycetales, sino dentro de la Familia <i>Bacillaceae</i></p>	<p><i>Thermoactinomyces</i></p>
Thermomonosporaceae	<p>Micelio aéreo y vegetativo. Micelio vegetativo puede fragmentar. Pared celular tipo III (algunos IV)</p> <p>Esporas individuales, en paredes o en cadenas cortas, encerradas en vaina.</p>	<p><i>Actinomadura</i> <i>Microbispora</i> <i>Microtetraspora</i> <i>Saccharomonospora</i></p> <p><i>Thermomonospora</i></p>
No designados	<ol style="list-style-type: none"> 1. Micelio rudimentario, se rompe en elementos móviles. Gram negativos. 2. No forma micelio aéreo. Micelio vegetativo rompe en elementos móviles (fragmentación de esporas). Pared celular tipo IV. 3. Sin micelio aéreo. Fragmentos de micelio vegetativo, producen esporas individuales. 4. Micelios aéreos y vegetativos no fragmentados. Pared celular tipo IV. Esporas formadas en micelio vegetativo y áreo. 5. Sin micelio vegetativo. Pared celular tipo I. Pedúnculos que soportan cadenas cortas de oosporas 	<p><i>Mycoplana</i></p> <p><i>Oerskovia</i></p> <p><i>Promicromonospora</i></p> <p><i>Pseudonocardia</i></p> <p><i>Sporichthya</i></p>

Fuente: (Franco, 2008).

La composición de la pared celular de los actinomicetos varía mucho según los géneros y tiene una importancia taxonómica considerable, permitiendo agrupar en cuatro los principales tipos de pared celular (tabla 3), donde las características según la estructura y la composición del peptidoglucano son:

- La ubicación del aminoácido en la posición 3 de la cadena lateral del tetrapéptido.
- La presencia de la glicina en los puentes interpeptídicos
- El tipo de azúcares que contiene el peptidoglucano

Tabla 3. Tipos de paredes celulares de los actinomicetos

Tipo	Isómero de ácido diamino-pimérico	Glicina en el puente interpeptídico	Azúcares Característicos	Grupos representativos
I	L,L	+	NA	<i>Nocardioides</i> <i>Streptomyces</i>
II	Meso	+	NA	Micromonospora Pilimelia Actinoplanes
III	Meso	-	NA	<i>Actinomadura</i> <i>Frankia</i>
IV	Meso	-	Arabinosa, galactosa	<i>Saccharomonospora</i> <i>Nocardia</i>
NA: no aplicable, o bien no se detecta un azúcar diferencial				

Fuente: (Franco, 2008)

1.2.2. Identificación molecular de bacterias mediante aislamiento de ADNr

Los ribosomas son orgánulos complejos, altamente especializados que utilizan los organismos para el proceso de síntesis de proteínas. El ribosoma bacteriano tiene un coeficiente de sedimentación de 70S y puede disociarse en dos subunidades desiguales en tamaño, con valores de sedimentación (Svedbergs) de 30S y 50S (Rodicio et al, 2004).

La subunidad pequeña (30S) consiste de una molécula de ARNr 16S y 21 proteínas diferentes, mientras que la subunidad grande (50S) contiene una molécula de ARNr 5S y otra de ARNr 23S, con 31 proteínas diferentes. El ARNr 16S de *Escherichia coli* consiste de

1542 nucleótidos, de los cuales el 46% están apareados entre sí. Esta molécula posee 4 dominios en su estructura secundaria. (Sivakumar, s.f.)

Debido a que los ribosomas son críticos para la función celular e interaccionan con un gran número de otras moléculas, incluyendo el ARN mensajero (ARNm) y el ARN de transferencia (ARNt), las secuencias de las moléculas de ARNr están altamente conservadas a través de la evolución, constituyéndose en la base para los estudios de filogenia (figura 3). Estas estructuras primarias están compuestas por regiones alternadas de alta y baja variabilidad, las regiones con secuencias variables contienen información de bajo nivel filogenético, mientras que las regiones con secuencias preservadas contienen información de los eventos evolutivos más tempranos (Herrera, 2003).

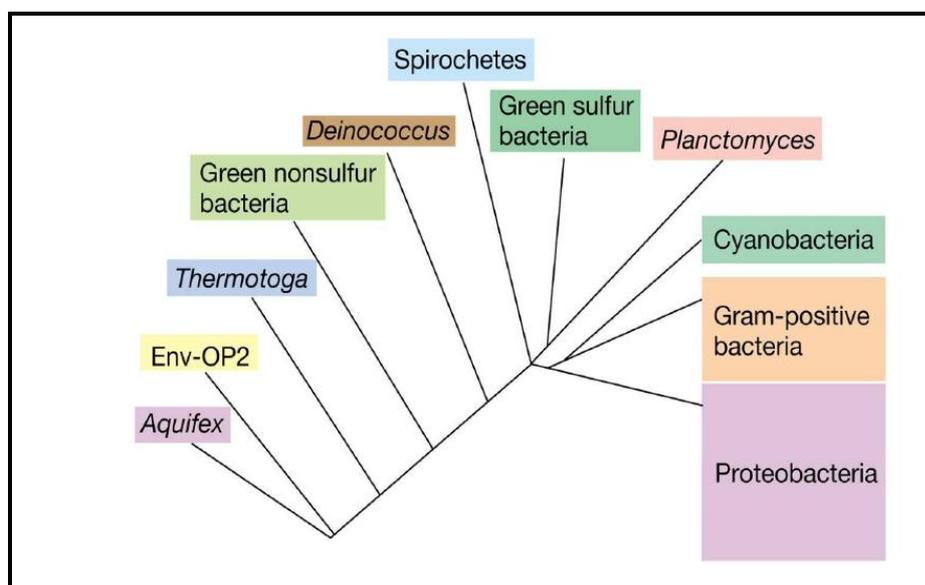


Figura 3. Filogenia del Dominio bacteria basada en el análisis de la región ADNr 16S
Fuente: (Dhruvil, 2012)

Las subunidades 16S y 23S son moléculas grandes y por ende tienen información suficiente para hacer comparaciones; el ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana, en su secuencia de nucleótidos tiene regiones altamente conservadas y regiones variables, las cuales permiten la medida de relaciones filogenéticas entre taxa cercanos o distantes y la capacidad de resolver el dominio, división, familia, clase, orden, género y especie de los microorganismos analizados (Franco, 2008).

El análisis de filogenia se inicia a través del aislamiento de ADN, y la amplificación del gen que codifica para la región ARNr 16S utilizando reacción en cadena de la polimerasa y primers universales bacterianos (Chun et al, 2007). Los fragmentos de ADN purificados se analizan mediante un secuenciador de ADN con el fin de determinar el orden en el que las bases están dispuestos dentro de la longitud de la muestra, luego se construyen los árboles filogenéticos mediante programas computarizados que reflejan la genealogía de la bacteria (figura 4) (Rodicio et al, 2004).

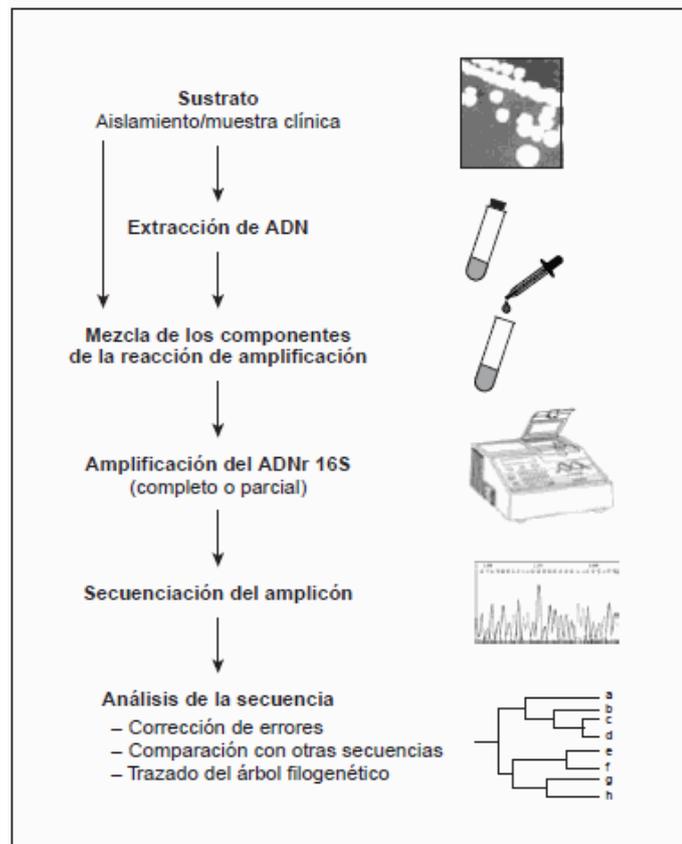


Figura 4. Etapas a seguir en el proceso de identificación bacteriana mediante la secuenciación de ADNr 16S.

Fuente: (Rodicio et al, 2004)

1.3. Métodos de aislamiento e identificación de metabolitos secundarios

1.3.1. Cromatografía

La Cromatografía es una técnica que permite la separación de los componentes de una mezcla debido a la influencia de dos efectos contrapuestos. Los componentes de la mezcla pasan a través de una fase estacionaria mediante el flujo de una fase móvil y las separaciones están basadas en las diferencias en la velocidad de migración entre los componentes de la muestra en la fase móvil (Harvey, 2002; Holler et al, 1995)

1.3.2. Cromatografía de adsorción

La adsorción es la propiedad que tienen ciertos sólidos de aumentar la concentración en su superficie de otras sustancias. La separación se debe a las diferencias de adsorción de los componentes de una mezcla sobre la fase estacionaria. La fase estacionaria es un sólido polar de gran superficie (adsorbente). La fase móvil puede ser un gas o un líquido dando lugar a la cromatografía gas-sólido (CGS) o líquido-sólido (CLS). El grado de adsorción varía según la naturaleza y superficie específica de los adsorbentes y naturaleza de los solutos. Los enlaces entre moléculas adsorbidas y el adsorbente deben ser débiles para que su fijación sea reversible, las uniones son debidas a fuerzas intermoleculares (interacciones dipolo-dipolo o puentes de hidrógeno). Como regla general, las polaridades del adsorbente y de los solutos han de ser opuestas. (Harvey, 2002)

1.3.3. Cromatografía en Columna en gel de sílice

Es el método más utilizado para la separación de compuestos orgánicos a escala preparativa. La fase estacionaria se deposita en el interior de una columna de vidrio que termina con una placa porosa que impide su paso y en un estrechamiento con una llave. La mezcla se deposita sobre la parte superior de la fase estacionaria mientras que la fase móvil atraviesa el sistema. Los compuestos van saliendo por separado de la columna y se recogen en fracciones, los más polares quedan más retenidos y para que salgan generalmente hace falta aumentar la polaridad del disolvente. El tiempo necesario para eluir un compuesto de la columna se llama tiempo de retención y el adsorbente más utilizado para cromatografía de columna es gel de sílice, aunque también se puede emplear alúmina y florisil (Mikes, 1979).

1.3.4. Cromatografía en capa fina

En la Cromatografía en fase normal, la fase móvil es líquida y la fase estacionaria es un componente polar. El eluyente es por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares.²

La mayoría de las placas de cromatografía llevan un indicador fluorescente que permite la visualización de los componentes activos a la luz ultravioleta (254 nm). En el caso de componentes que no absorban a la luz ultravioleta, la visualización requiere utilizar un agente revelador. El revelador reacciona con los productos proporcionando productos coloreados.³

1.3.5. Cromatografía de gases-Espectroscopia de masas

Es una técnica de análisis cualitativo y cuantitativo, de amplia utilización para la determinación de estructuras orgánicas. Presenta dos características fundamentales: con cantidades extraordinariamente pequeñas de muestra se puede determinar la masa relativa de una sustancia y por otro lado este valor másico permite calcular la fórmula molecular del compuesto problema (Hesse et al, 2005).

La espectrometría de masas está basada en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa, una vez obtenidos estos iones se separan de acuerdo con su masa y su carga, y finalmente se detectan por medio de un dispositivo adecuado. La presencia y abundancia en el espectro de determinados tipos de iones, identificables a partir de su masa será en función de la estructura química, ofreciendo una enorme cantidad de información sobre un compuesto determinado.⁴

² Técnicas Cromatográficas. Universidad Autónoma de México. Recuperado de: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf

³ Introducción a la Cromatografía. Recuperado de: http://ocw.uv.es/ocw-formacio-permanent/2011-1-35_Manual.pdf

⁴ Espectrometría de Masas. Recuperado de: http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES//investigacion/cromatografia/espectrometria_de_masas.pdf

1.3.6. Resonancia magnética nuclear de protón

La Resonancia magnética nuclear es un método espectral basado en las propiedades magnéticas de los núcleos y es usada para la identificación de estructuras orgánicas. Esta técnica espectroscópica puede utilizarse sólo para estudiar núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones (o de ambos), como en el caso de los átomos de ^1H , ^{13}C , ^{19}F y ^{31}P .⁵

La información estructural contenida en un espectro de protón de una molécula en estudio se infiere a través del análisis de los datos de desplazamiento químico (figura 5), integración de las señales de protón y del acoplamiento espín-espín.

⁵ Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear. Recuperado de:
<http://www.sinorg.uji.es/Docencia/FUNDQO/TEMA10FQO.pdf>

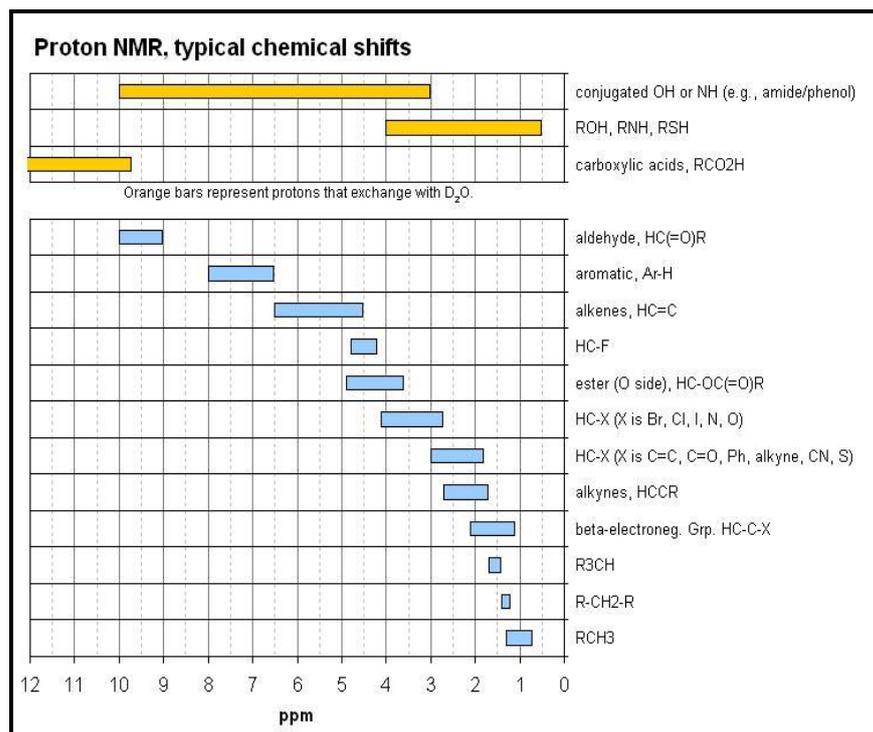


Figura 5. Valores de desplazamiento químico de protones.

Fuente: ("Chemical Shift," s.f)

1.4. El Fenómeno de la resistencia microbiana

El fácil acceso y el uso inapropiado de fármacos para combatir las infecciones causadas por microorganismos patógenos, promueve la autoprescripción, lo que facilita la selección persistencia y diseminación de microorganismos resistentes (Leiva, et al 2004)

De acuerdo con los Centros de Control de Enfermedades (CDC), en un periodo de 5 años ha sido evidente el aumento de la resistencia a *Pseudomonas aeruginosa* al imipenem (23%) y las quinolonas (53%), de *Staphylococcus aureus* a la meticilina (29%) y de *Enterococcus faecalis* a la vancomicina (31%); limitando la eficacia de los antimicrobianos actuales.⁵

El problema no solo es de resistencia a los antibióticos, sino también a múltiples fármacos. Las llamadas "superbacterias" (organismos que son resistentes a la mayoría de los antibióticos utilizados clínicamente) están surgiendo a un ritmo acelerado. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina es responsable de muchos casos de infecciones cada año. Hay otros ejemplos de bacterias resistentes Gram-positivas principalmente de los géneros *Enterococcus* y *Streptococcus* y de bacterias Gram-negativas (*Klebsiella*, *Escherichia*,

Enterobacter, *Serratia*, *Citrobacter*, *Salmonella* y *Pseudomonas*), por lo que, la necesidad de encontrar nuevos antibióticos es clara (Demain et al, 2009).

Las enfermedades infecciosas emergen como una causa importante de mortalidad en todo el mundo y exige un enfoque minucioso y atento que permita lograr su control y su prevención. La Organización Mundial de la salud (OMS) ha declarado que el fenómeno de la resistencia es una de las prioridades en salud pública; pero los esfuerzos por manejar la resistencia antimicrobiana en general son insuficientes frente a la magnitud del problema (Zurita, 2002).

Según los últimos datos disponibles, en el año 2008 según la Red Nacional de Resistencia Bacteriana de Ecuador (REDNARBEC), la resistencia de *Shigella* spp. a tetraciclina era del 96% y a ampicilina 93%, así mismo, *Salmonella* spp. era resistente a tetraciclina en un 30%, *Escherichia coli* era resistente a ampicilina y tetraciclina en un 71%, *Staphylococcus aureus* era resistente a eritromicina en un 30% y oxacilina en un 25%. A nivel hospitalario *Escherichia coli* presentó hasta un 77% de resistencias a ampicilina, *Klebsiella pneumoniae* era resistente en un 65% a cefotaxima, *Enterobacter* presentó un 67% de resistencias a ampicilina sulbactam, *Staphylococcus aureus* fue resistente en un 41% a oxacilina, *Acinetobacter baumannii* era resistente a trimetoprima + sulfametoxazol en un 68% y a ciprofloxacina en un 64%, *Pseudomona aeruginosa* era resistente a gentamicina en un 55% y a ciprofloxacina en un 54%. (Quizhpe et al, 2011)

CAPÍTULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Reactivación de la cepa bacteriana MJG-7

La cepa MJG-7 se reactivó tomando 100 µL a partir de reserva criogénica mantenida a -80°C, en 50 mL de medio marino A1 (Anexo 1), se agitó a 200 rpm, 30°C y 7 días de incubación.

2.2. Identificación morfológica de la cepa bacteriana MJG-7

Se realizó la identificación macroscópica y microscópica de la cepa de estudio. Se observaron las características morfológicas presentadas en la superficie del agar como en el reverso y, adicionalmente, la presencia de coloración en las colonias o en el medio de cultivo. Se empleó tinción Gram para observar la forma y color de las estructuras bacterianas y de los filamentos miceliales.

2.3. Aislamiento de ADNr; PCR; secuenciación y análisis filogenético

Previo a la extracción de ADN de la cepa bacteriana MJG-7, se realizó el proceso de reactivación de la misma como se muestra en el apartado 2.1.

El ADN total fue extraído aplicando el protocolo para bacterias Gram-positivas, según las especificaciones presentadas en PureLink™-Genomic DNA Mini Kit de (Invitrogen).

La amplificación de ADNr se llevó a cabo con la combinación de primers universales para bacterias 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG Lane et al. 1991) y 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT; Turner et al. 1999) para la región parcial 16S.

Las condiciones de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) fueron: desnaturalización inicial de 98°C por 30 s seguido de 30 ciclos; cada ciclo consiste en un paso de desnaturalización de 98°C por 10 s, temperatura de anillamiento para la combinación de primers de 60°C por 20 s, una extensión de 72°C por 30 s seguido de una extensión final de 72°C por 10 min. El volumen total de reacción fue de 20 µL con una concentración final de 1 pmol por cada primer, 1% Albúmina de Suero (BSA-SIGMA) con concentración final de 0.8 µg/µL (Iotti and Zambonelli 2006) y 1U de Finnzymes' Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase®. No se usó control positivo ni diluciones para el ADN en estudio. El éxito de la PCR fue evaluado en gel de agarosa 1% teñido con GelRed® Nucleic Acid Gel Stain, 3X en

agua (Biotum, Hayward, CA, USA). Previo a la Secuenciación los productos fueron purificados con QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen).

La secuenciación se llevo a cabo en el equipo 3500RUO Genetic Analyzer (Applied Biosystems) de 8 capilares, desde la Universidad Técnica Particular de Loja.

Los cromatogramas de las secuencias obtenidas se analizaron en el programa Sequencher 4.6 (Gene Codes, Ann Arbor, MI, USA) en busca de errores de secuenciación. Las secuencias verificadas se utilizaron para compararse en la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) en busca de las secuencias referentes más cercanas. Las secuencias obtenidas en este estudio en conjunto con las más cercanas desde la base de datos fueron alineadas usando el algoritmo G-INS-i implementado en el programa MAFFT v5.667 (Kato et al. 2002).

El árbol filogenético de la región parcial 16S fue generado con varios algoritmos incluidos en el análisis de *Neighbor-joining* (NJ) desarrollado en el programa PAUP* (Swofford, 2002) y el análisis de *Maximum likelihood* (ML) desarrollado en el programa MEGA5.

2.4. Cultivo y Obtención de extracto de la cepa MJG-7

2.4.1. Cultivo

La cepa MJG-7 fue reactivada como se menciona en el apartado 2.1. Con el cultivo obtenido y luego de comprobar su pureza se continuó con el escalado en frascos Fernbach 2,8 L contenido en cada uno 1 L de medio marino A1, agitación de 200 rpm e incubación a 30 °C por 7 días.

2.4.2. Obtención del extracto

Después de 7 días de cultivo se añadió resina esterilizada XAD- 7HP (SIGMA) en una proporción de 20 g/L para adsorber los productos orgánicos en el medio de cultivo. La resina se lavó con metanol previo a su uso, luego se transfirió de manera estéril al medio de

cultivo y se agitó durante dos horas a 200 rpm. La resina fue retenida mediante filtración en gasa estéril lavado con agua destilada y el residuo se extrajo con AcOEt; finalmente la fracción soluble en AcOEt se secó a temperatura de 30°C y al vacío en un equipo rotaevaporador para la obtención del extracto seco.

2.4.3. Fraccionamiento en columna en gel de sílice

El extracto total se disolvió en metanol y la fracción soluble fue concentrada nuevamente al vacío hasta sequedad. La fracción soluble se cargó sobre gel de sílice como soporte cromatográfico en proporción 1: 50 (extracto: sílice)

El montaje de la fase estacionaria en la columna se realizó en húmedo suspendiéndola en un exceso de n-hexano y el extracto fue mezclado con una pequeña proporción de sílicagel para formar una matriz homogénea para la corrida cromatográfica. Los solventes de partida durante la elución se determinaron en función del comportamiento del extracto en CCF. Las fracciones obtenidas fueron recolectadas en tubos de 10 ml y como procedimiento de monitoreo de la columna se utilizó cromatofolios de aluminio de sílicagel G60 F254; las placas fueron visualizadas mediante luz UV (254-365nm) y reveladas con Óleum⁶.

2.5. Cromatografía de gases- Espectrometría de masas

Para el análisis se escogieron las siguientes fracciones: 1 (3y4), 2 (7y8), 3 (9-14), 4 (23-30), 5 (25) por sus características presentadas en las placas de Cromatografía en Capa Fina. Se disolvieron las muestras a una concentración de 10 ppm en Diclorometano. El análisis se realizó en un equipo Agilent Technologies 6890N acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent Technologies 5973 Inert) con una columna cromatográfica DB5- MS. Los datos espectrales obtenidos se compararon con la base de datos Wiley 7.0n. Las condiciones fueron las siguientes:

HORNO

Temperatura inicial: 50 °C

⁶ Composición del Óleum: AcOH:80%, H₂O:16%, H₂SO₄ 4%

Rampas:

#	Velocidad	Temperatura Final	Tiempo Final
1	20,00	200	0,00
2	15,00	250	10,00
3	5,00	270	25,00
4	0,0 (off)		

Tiempo de ejecución: 51,83 minutos

INYECTOR (SPLIT/SPLITLESS)

Modo: Split
Radio de Split: 10:1
Tipo de Gas acarreador: Helio

COLUMNA

Columna Capilar DB-5
Modelo: Agilent 122-5532
Temperatura Máxima: 350 °C
Flujo constante
Flujo Inicial: 1,0 mL/min
Salida: MSD

RANGO DE PARÁMETROS DE DETECCIÓN DE PESO MOLECULAR

Peso molecular bajo : 60,0
Peso molecular alto : 580,0

Quadropolo MS: 200 C
Fuente MS : 230 C

Energía: 70 ev.

2.6. Resonancia magnética nuclear de protón

Los espectros de resonancia de protón fueron realizados en un equipo Varian operando a 400 MHz. Se empleó Cloroformo-d para la disolución de las muestras. Los datos obtenidos fueron analizados en el programa MestRenova v. 6.0.2.

2.7. Método de micrudilución en caldo

2.7.1. Cultivo overnight

Para la preparación de los inóculos bacterianos se partió de reserva criogénica a -80°C en medios específicos para cada bacteria. Se incubaron a 37°C en un periodo de 14 a 16 horas. Se utilizó caldo Triptisoya para las bacterias: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus Aureus*, caldo Muller Himnton (Difco) para *Proteus vulgaris* y, caldo Oxoid no. 2 (Oxoid) para *Salmonella typhimurium* y caldo Infusión Cerebro Corazón (Bacto) para *Enterococcus faecalis*.

2.7.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Los valores de CMI se determinaron por el método de microdilución en caldo usando una concentración final de 5×10^5 cfu/mL para bacterias Gram-negativas [*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC9997), *Proteus vulgaris* (ATCC 8427), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (LT2)] y bacterias Gram-positivas [*Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)], y una concentración final de 5×10^4 esporas/mL para hongos dermatofitos [*Trichophyton rubrum* (ATCC 28188) y *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 28185)]. La CMI se define como la concentración más baja de sustancia que previene el crecimiento, la cual se determina por la presencia de turbidez después de 24 horas de incubación para bacterias o de crecimiento micelial después de 96 horas de incubación para hongos. Se preparó una disolución de extracto en DMSO a una concentración de 20 mg/mL. El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pocillos y se siguió el procedimiento de dilución doble seriada para obtener concentraciones desde 1000 $\mu\text{g/mL}$ a 7,81 $\mu\text{g/mL}$. La incubación se realizó a 37°C para bacterias y 30°C para dermatofitos (CLSI. M7-A7; CLSI. M38-A2, 2002; CLSI. M100-S21).

Se usó gentamicina como control positivo para cinco bacterias con un valor de CMI de 0,39 $\mu\text{g/mL}$, mientras que se usó ampicilina como control positivo para *E. faecalis* and *S. typhimurium*, con un valor de CMI de 3,12 $\mu\text{g/mL}$. Para dermatofitos se empleó Itraconazol con un valor de CMI de 0,48 $\mu\text{g/mL}$ for fungi. Como control negativo se usó DMSO.

CAPITULO III
RESULTADOS y DISCUSIÓN

3.1. Morfología de la cepa MJG-7

La cepa MJG-7 fue identificada macroscópicamente y microscópicamente teniendo en cuenta propiedades que las diferencian de bacterias no filamentosas y de hongos. Se pudo observar sobre el Medio marino A1 (Anexo 1), una colonia seca pulverulenta de color rosado tenue (micelio aéreo) en el anverso de la placa, mientras que al reverso no se observó la presencia de coloración o pigmentación.

Al microscopio óptico y mediante tinción Gram, se observaron estructuras miceliales no fragmentadas, ramificadas, con un gran número de bacterias circundantes en forma de bacilos ovalados y con una coloración violeta indicadora del grupo de las bacterias Gram-positivas, lo que nos permitió identificarla como perteneciente al Orden Actinomycetales. Observando el cultivo en fresco mediante microscopía de contraste de fases se identificaron estructuras miceliales y un gran conglomerado de bacterias no motiles (figura 6)

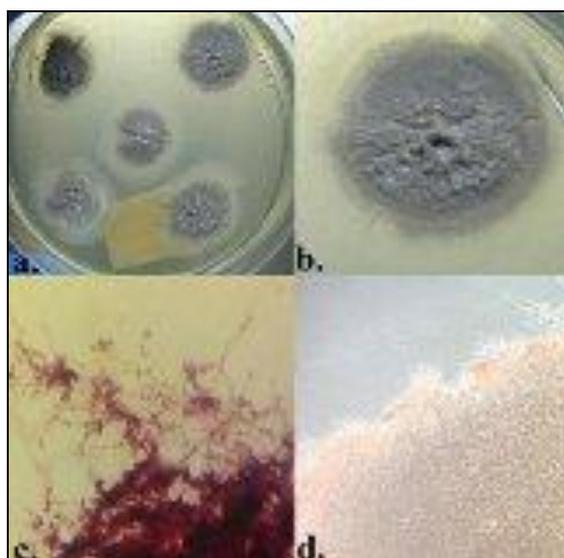


Figura 6. **a y b.** Morfología de la cepa MJG-7 en cultivo en placa; **c.** Tinción Gram (100X); **d.** Microscopía en contraste de fases (40X).

Fuente: Autora

3.2. Identificación molecular mediante análisis de ADNr 16S

Con la obtención de una secuencia con una longitud de 1100 pares de bases (Anexo 2) se logró una comparación filogenética con secuencias relacionadas hasta nivel de género y, aplicando una secuencia correspondiente a la especie *Streptosporangium roseum* como

grupo externo, pudimos ubicar a nuestra cepa MJG-7 dentro del género *Streptomyces*. Nuestra secuencia MJG-7 en el árbol filogenético se encuentra distante de sus parientes y sin un soporte estadístico desde NJ y ML. atribuible a la falta de secuencias en la base de datos Genbank, lo que no permitió establecer una relación más estrecha entre ellos. Estos datos sugieren a nuestra cepa de *Streptomyces* MJG-7 como algo novedoso para la ciencia. Nuestra cepa se encuentra distante de otra especie de *Streptomyces* codificada MJG-3 que fue aislada desde sedimentos marinos en la misma zona de recolección (manglar de Jambelí, El Oro, Ecuador). Nuestros datos moleculares también son apoyados con la información de crecimiento de estas bacterias, el cual es diferente en similares medios de cultivo.

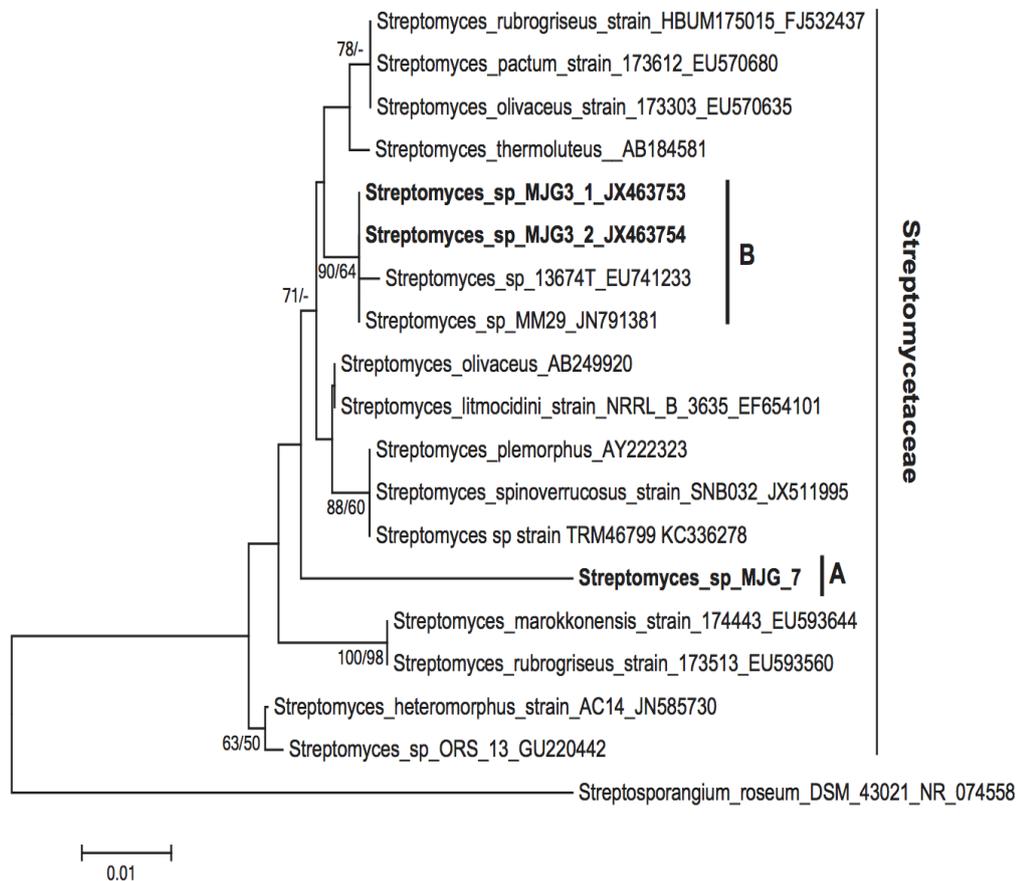


Figura 7. Hipótesis filogenética para 16S parcial inferida mediante Neighbor joining y Maximun Likelihood. Valores superiores de bootstrap al 50% de NJ y ML están representados sobre los clados. *Streptosporangium roseum* NR 074558 es presentado como grupo externo.

Fuente: Autora

3.3. Obtención de extracto y fraccionamiento

3.3.1. Extracto en Acetato de Etilo

Se obtuvo 2,075 g de extracto constituido como una mezcla viscosa de color morado, con un bajo rendimiento, a pesar de haber empleado todas las condiciones de crecimiento necesarias para imitar su ambiente natural de crecimiento como lo menciona Mateos P, (2006) en su trabajo sobre la producción industrial de metabolitos secundarios. Las características se observan en la tabla 4:

Tabla 4. Características del extracto crudo MJG-7

Extracto Crudo MJG-7	
Consistencia	Mezcla Viscosa
Color	Morado
Cantidad	2,075 g/10L
Solubilidad	Acetato de Etilo



Fuente: Autora

3.3.2. Cromatografía en columna en gel de sílice

Del fraccionamiento del extracto total en Cromatografía en Columna abierta en gel de sílice (CC) se obtuvieron 146 fracciones. Se realizó el fraccionamiento con polaridad creciente en proporciones definidas como se observa en la tabla 5.

La complejidad del extracto y el escaso rendimiento obtenido, determinaron los pesos resultantes de las fracciones durante la separación cromatográfica. Los pesos de las fracciones y las eluciones empleadas para el aislamiento se resumen en la Tabla 5. Es importante indicar que la matriz empleada para la separación retuvo una gran cantidad del extracto, permitiendo, a partir de 1,36 gramos introducidos en la columna, obtener un peso total de 583 mg (146 fracciones). Se empleó Acetato de etilo como solvente final de separación, evitando el uso de metanol, debido a que este último, podría arrastrar el soporte junto con el extracto restante.

Del análisis de cromatografía en capa fina se reunieron aquellas fracciones que presentaron un comportamiento cromatográfico similar.

Tabla 5. Fraccionamiento del extracto MJG-7

COLUMNA MJG-7			
Fracciones colectadas	Fase Móvil	Codigo RMN*	Peso
1,2	8:2 Hx-AcOEt		36mg
3,4	8:2 Hx-AcOEt	Gx-1	32mg
5,6	8:2 Hx-AcOEt	Gx-2	31mg
7,8	8:2 Hx-AcOEt		28mg
9	8:2 Hx-AcOEt	Gx-3	20mg
11	8:2 Hx-AcOEt	Gx-4	14mg
10,12,13,14	8:2 Hx-AcOEt		24mg
15-18	8:2 Hx-AcOEt	Gx-5	140mg
19-22	8:2 Hx-AcOEt		35mg
23,24,26,27,28,30	8:2 Hx-AcOEt	Gx-8	28mg
25	8:2 Hx-AcOEt	Gx-6	16mg
29	8:2 Hx-AcOEt	Gx-7	1 mg
31-52	7:3 Hx-AcOEt		30mg
53-86	6:4 Hx-AcOEt	Gx-9	38mg
87-99	5:5 Hx-AcOEt		5mg
100-111	4:6 Hx-AcOEt		29mg
112-114	4:6 Hx-AcOEt		12mg
115-124	3:7 Hx-AcOEt		16mg
125-131	3:7 Hx-AcOEt		12mg
132-137	2:8 Hx-AcOEt		9mg
138-145	2:8 Hx-AcOEt		13mg
146	AcoEt 100%		14mg
Total:			583mg

Fuente: Autora

* Los códigos Gx-1 a Gx-9 sirven como referencia de las fracciones reunidas para el análisis de RMN y no representan ningún procedimiento cromatográfico

3.4. Identificación por Cromatografía de gases-Espectroscopía de masas

Del análisis de la fracción (3 y 4) se encontró la presencia de PARASITICOL con un 92% y un tiempo de retención de 14,45 minutos. Según Stubblefield et al, (1970) este metabolito fue descrito como procedente de una cepa de *Aspergillus parasiticus*, pero su aislamiento no se ha reportado para especies del orden Actinomycetales. Se observó también la presencia de un compuesto denominado Bis (2-etilhexil)ftalato con un 72% y un tiempo de retención de 15,45 minutos siendo este metabolito reportado como procedente de *Streptomyces mirabilis* por El-Sayed M, (2013), (Figura 8). También se analizaron la reunión de las fracciones: (7y8); (9-14); (23-30) y la fracción 25 cuyos resultados no fueron concluyentes ya que no permitieron identificar los componentes de las mezclas probablemente debido a problemas en la volatilización de los mismos.

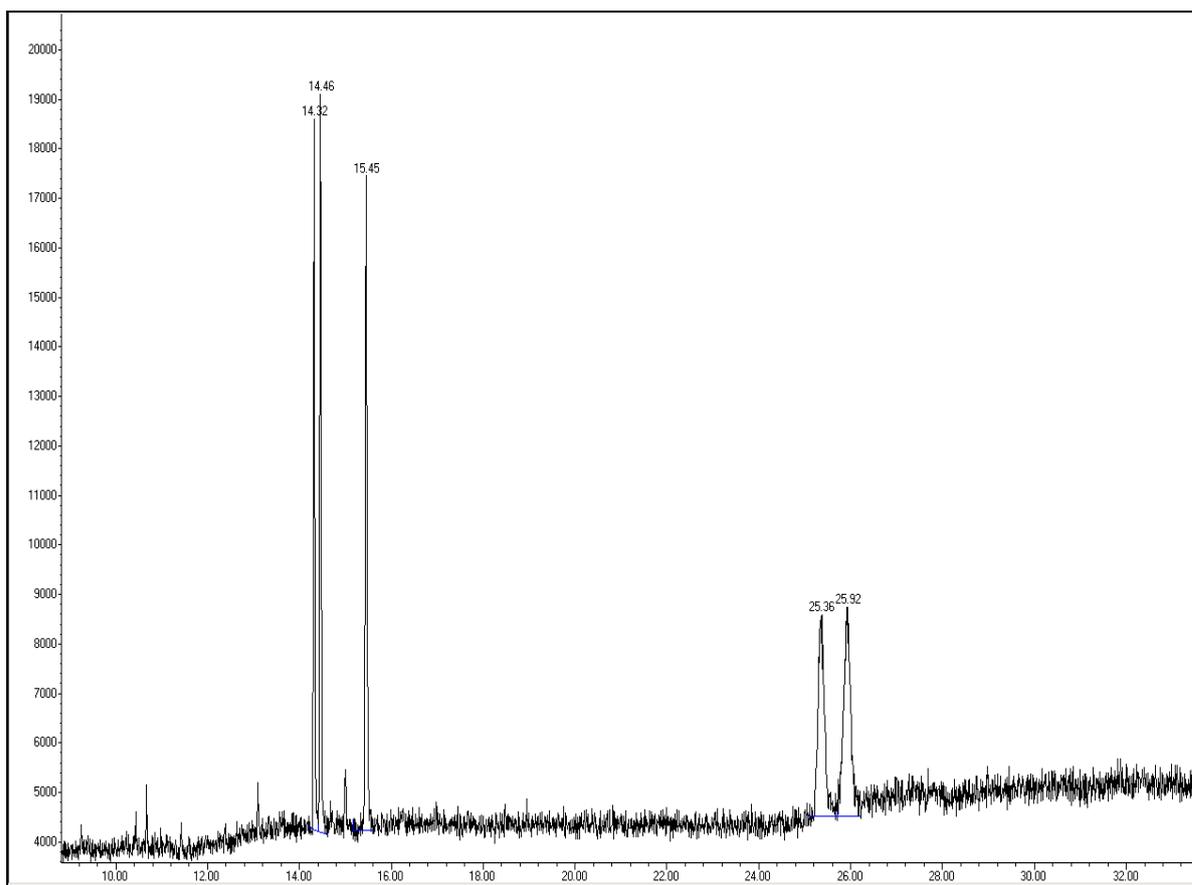


Figura 8. Cromatograma de la fracción (3 y 4) donde se muestran los tiempos de retención de cada compuesto

Fuente: Autora

3.5. Resonancia magnética nuclear

Del estudio de Resonancia Magnética Nuclear de Protón de las fracciones 3 a la 30 (GX-1 a GX-7) y de las fracciones 53 a 86 (GX-9) (ver Tabla 5) se pueden derivar algunos datos estructurales que nos permiten inferir el tipo de compuestos presentes en el extracto en acetato de etilo de la cepa MJG-7 identificada como *Streptomyces* sp.

3.5.1. Análisis de composición de las fracciones GX-1 a la Gx-9

La fracción identificada como GX-1 resultante de la reunión de las fracciones 3 y 4, eluídas en una mezcla de n-Hex:AcOEt, 8:2, a través del estudio de RMN de ^1H , permitió identificar la presencia de un compuesto aromático en muy baja proporción en la mezcla. Las señales que permiten identificar su presencia se encuentran a 7.72 ppm y 7.53 ppm, ambas con constantes de acoplamiento escalar (J) de 3.3 Hz y 5.7 Hz y con una multiplicidad del tipo Doble doblete (dd). Adicionalmente se revelan señales correspondientes a protones en la zona de unión a heteroátomos (4.05 ppm a 4.37 ppm). La multiplicidad de las señales no se revela por solapamiento, por lo que no se puede calcular las constantes de acoplamiento escalar, pero se puede inferir la presencia de un compuesto poli-hidroxilado o varios compuestos hidroxilados. Al tratarse de una mezcla compleja no se puede asociar las señales del compuesto aromático y del polihidroxilado, debido a la dificultad para la integración en el espectro. Finalmente se puede detectar la presencia de metilos sp^3 (0.84 a 0.87 ppm) y metilenos (1.27 ppm) correspondiente a un compuesto del tipo ácido graso propio de las membranas biológicas de los microorganismos (figura 9.).

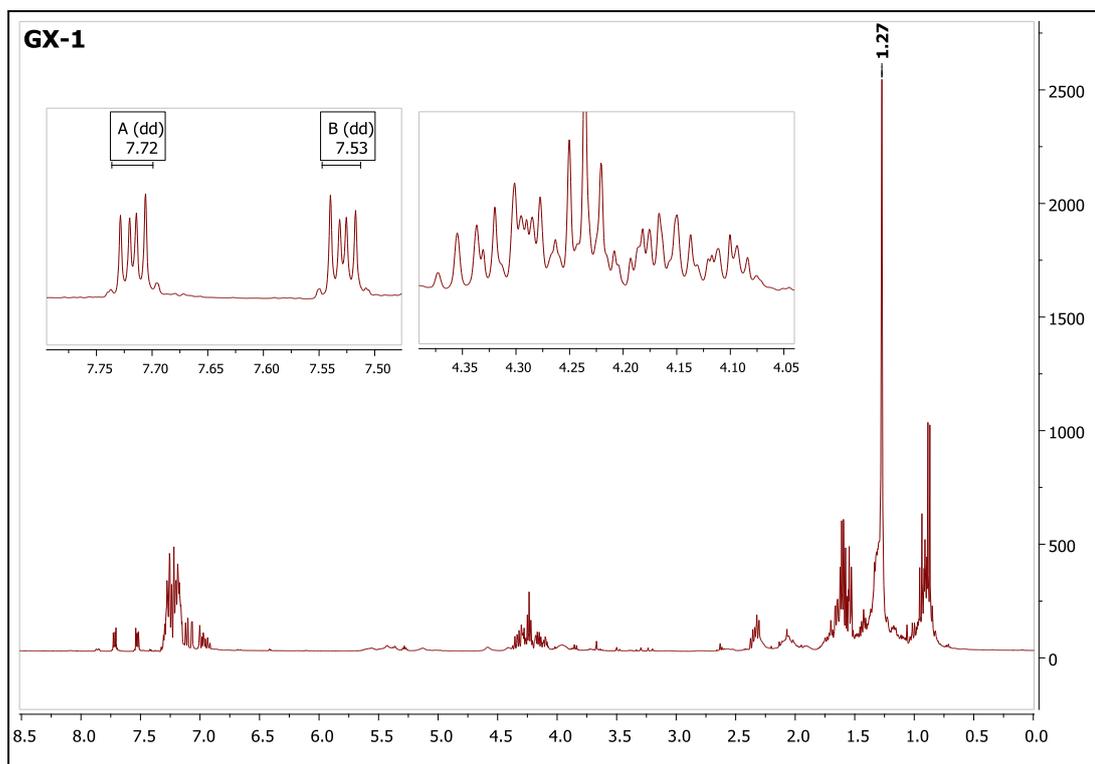


Figura 9. Espectro de Resonancia de Protón (400 MHz), de las fracciones 3-4 en Cloroformo-d

Fuente: Autora

La fracción identificada como GX-2 resultante de la reunión de las fracciones 5 y 6, eluidas en una mezcla de n-Hex:AcOEt, 8:2, a través del estudio de RMN de ^1H , permitió identificar la presencia de dos señales a campo bajo acopladas entre sí, con un desplazamiento químico de 6.76 ppm y 6.67 ppm, cuyas constantes de acoplamiento escalar (J) son 8.2 Hz y 1.5 Hz y con una multiplicidad del tipo Doble doblete (dd). El desplazamiento químico sugiere la presencia de protones olefínicos, pero las constantes de acoplamiento escalar de $J = 8.2$ Hz sugiere la presencia de un acoplamiento de tipo orto y la constante de acoplamiento escalar de $J = 1.5$ Hz sugiere la presencia de un acoplamiento de tipo meta; con lo cual la estructura sugerida del compuesto sería la de un benceno disustituído. Adicionalmente se revelan señales correspondientes a protones en la zona de unión a heteroátomos (4.05 ppm a 4.37 ppm) y se identifica una señal a 4.39 ppm con dos constantes de acoplamiento escalar ($J = 14.5$ y 7.2 Hz) correspondiente a acoplamientos de tipo axial-axial entre protones de un sistema saturado penta o hexa-cíclico (figura 10).

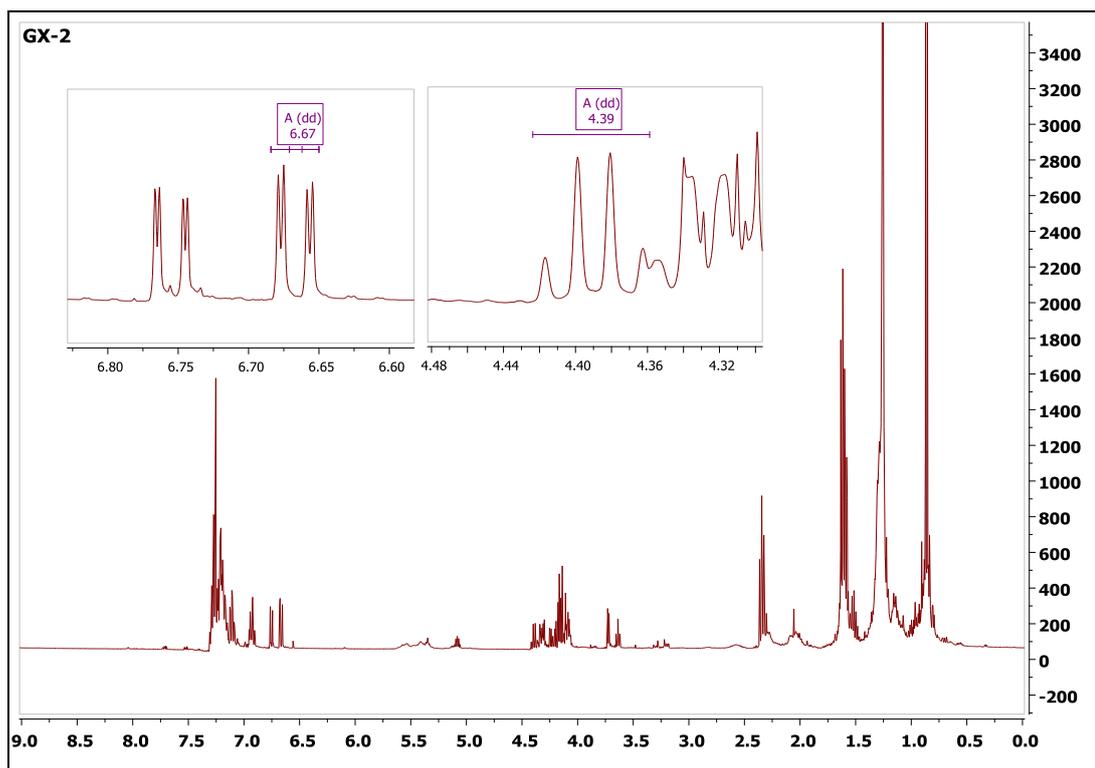


Figura 10. Espectro de Resonancia de Protón (400 MHz), de las fracciones 5-6 en Cloroformo-d

Fuente: Autora

Las fracciones 9 (GX-3) y 11 (GX-4) eluidas en una mezcla de n-Hex:AcOEt, 8:2, a través del estudio de RMN de ¹H, permitió identificar la presencia de un compuesto de tipo ácido graso, a través de la identificación de las señales típicas de metilos a campo alto 0.84 ppm, 0.86 ppm y 0.87 ppm y una señal de una gran intensidad a 1.25 ppm correspondiente a los protones metilénicos de la cadena carbonada, finalmente una señal típica a 2.34 ppm con una multiplicidad de tipo triplete (t) y constante de acoplamiento escalar $J = 7.20$, correspondiente a un metileno sp³ desplazado por su unión covalente a la funcionalidad éster. En la figura 11 se muestra únicamente el espectro del GX-3, siendo GX-4 de iguales características.

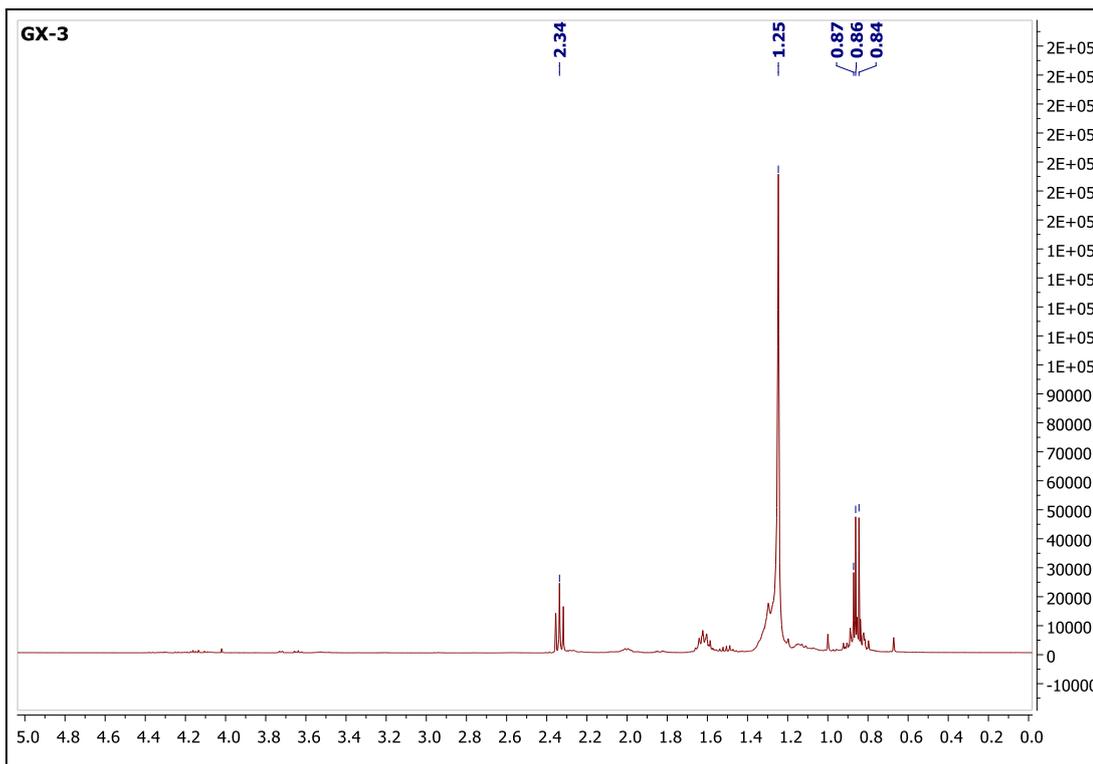


Figura 11. Espectro de Resonancia de Protón (400 MHz), de la fracción 9 en Cloroformo-d

Fuente: Autora

La fracción identificada como GX-2 resultante de la reunión de las fracciones 15 a la 18, eluídas en una mezcla de n-Hex:AcOEt, 8:2, a través del estudio de RMN de ^1H , permitió identificar una similitud metabólica con las fracciones GX-3 y GX-4, en cuanto a la presencia abundante del derivado de ácido graso, aunque se detecta la presencia de algunas señales a campo bajo de 6.12 ppm (s) y 5.59 ppm (s), típicos de olefinas, una señal de protón singlete a 3.47 ppm característico de un metilo enlazado a heteroátomo (grupo funcional metoxilo), una señal de protón singlete a 4.14 ppm en la zona de unión a heteroátomos. La multiplicidad de tipo singlete de esta señal (4.14 ppm) indica el desacoplamiento de este protón debido a que su carbono correspondiente está enlazado a carbonos cuaternarios (Figura 12.)

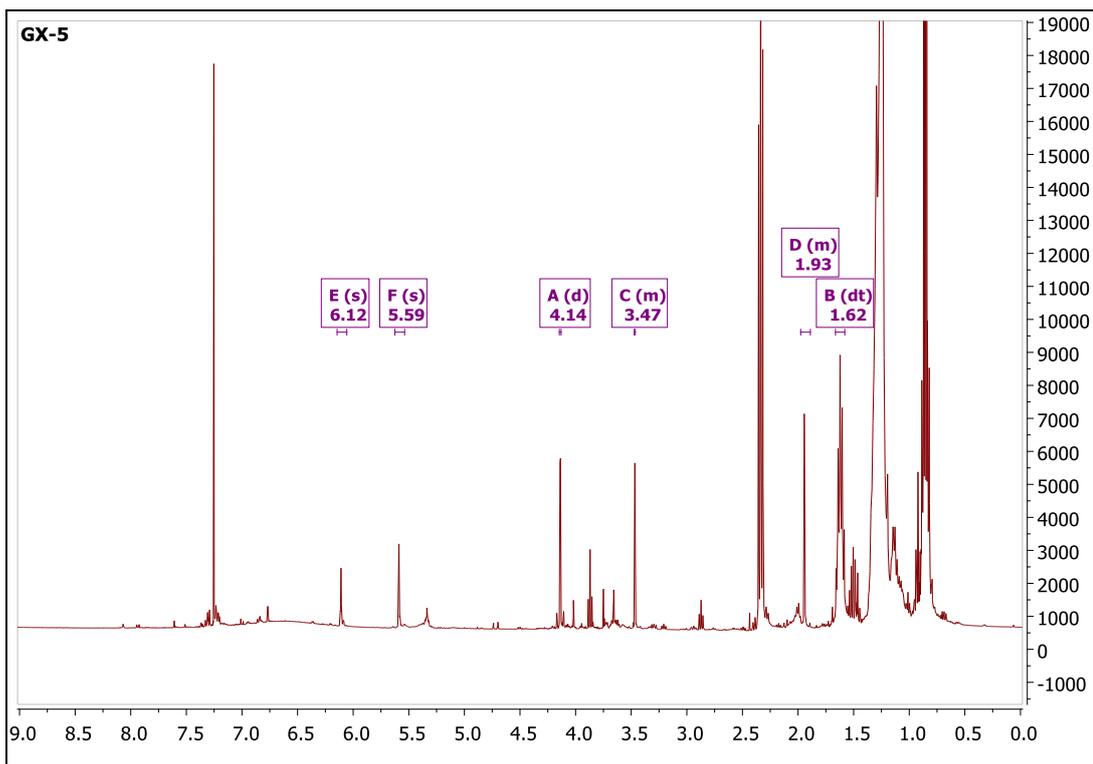


Figura 12. Espectro de Resonancia de Protón (400 MHz), de las fracciones 5 y 6, en Clorofórmico-d

Fuente: Autora

Las fracciones 25 (GX-6) y la fracción 29 (GX-7), a través del estudio de RMN de ^1H , permitió establecer una similitud metabólica, a diferencia de lo observado durante el seguimiento en cromatografía de capa fina donde se observaban diferencias en los valores de r_f de los compuestos presentes. Por tal razón, y debido a la mínima cantidad recolectada durante el fraccionamiento (ver tabla 5) se reunieron las fracciones 23 a la 30 y se etiquetó como GX-8. Todas estas fracciones fueron eluidas en una mezcla de n-Hex:AcOEt 8:2. A pesar del lento procedimiento de elución efectuado, el problema principal observado durante todo el fraccionamiento es el escaso poder de resolución del soporte empleado (silicagel G-60). En la figura 13 se evidencia la presencia de señales de protón enlazados a heteroátomos en la zona comprendida entre los 3.2 y 4.5 ppm, pero debido al solapamiento de señales no se pueden distinguir claramente los tipos de acoplamiento, excepto en la señal de protón con un desplazamiento químico de 4.17 con una multiplicidad del tipo doble cuarteto ($J = 11.75 \text{ Hz}, 4.65 \text{ Hz}$). Este tipo de multiplicidad es típica de un protón desplazado a campo bajo, por un entorno electronegativo, y enlazado su respectivo carbono a dos carbonos vecinales, un metilo y un metino, tal y como se observa en el caso del 1,1,2 tricloro propano donde las constantes J_{1-2} y J_{2-3} no son iguales.

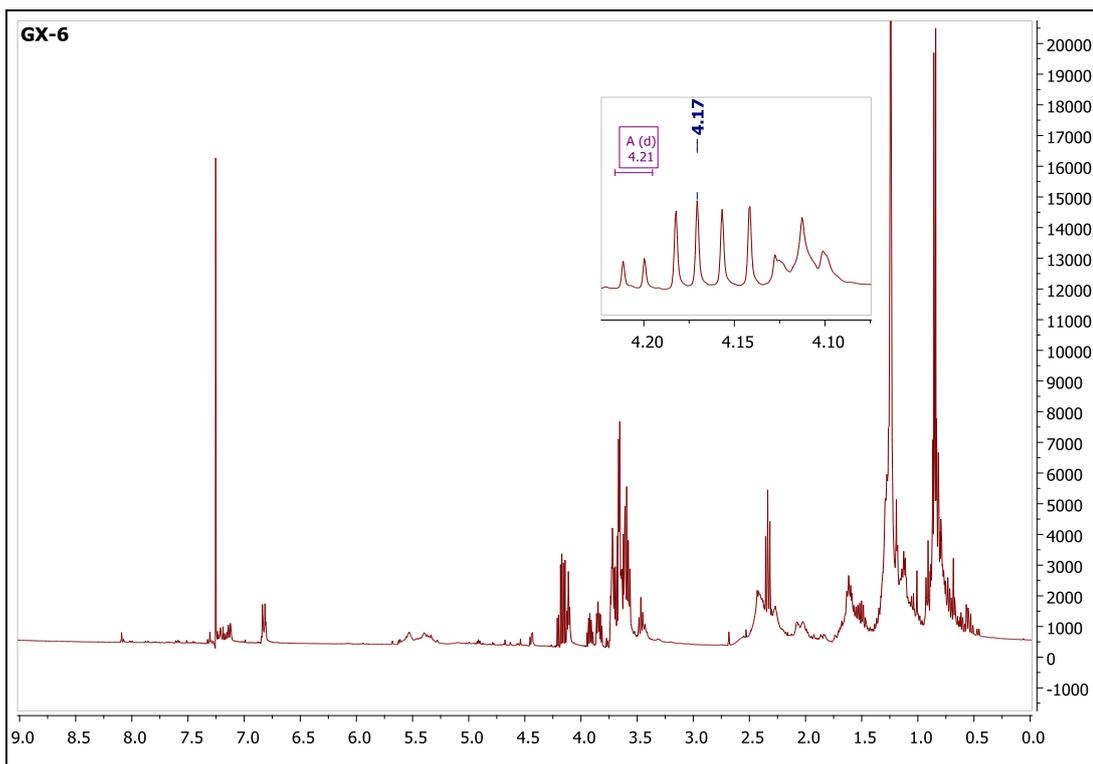


Figura 13. Espectro de Resonancia de Protón (400 MHz), de la fracción 25, en Cloroformo-d

Fuente: Autora

Las fracciones 53 a la 86, reunidas por su similitud cromatográfica y etiquetadas como GX-9, eluidas en una mezcla de n-Hex:AcOEt, 6:4, a través del estudio de RMN de ^1H , permitió identificar la presencia de varias señales a campo bajo con una patrón de multiplicidad complejo característico de protones aromáticos acoplados en posición orto o meta presentes en anillos bencénicos (7.81 ppm, doble triplete) y varias otras señales de protones aromáticos a campo bajo en la zona comprendida entre los 7.0 y 7.5 ppm, indicativo de la presencia de compuestos aromáticos en la fracción GX-9. Así mismo, se observan dos señales a 6.84 ppm y 6.82 ppm que confirman la riqueza metabólica de compuestos aromáticos en la fracción. Desafortunadamente, como se observa en el espectro de la figura 14, la proporción de los compuestos anteriormente indicados es insignificante en comparación a la cantidad del derivado de ácido graso presente aún en la fracción.

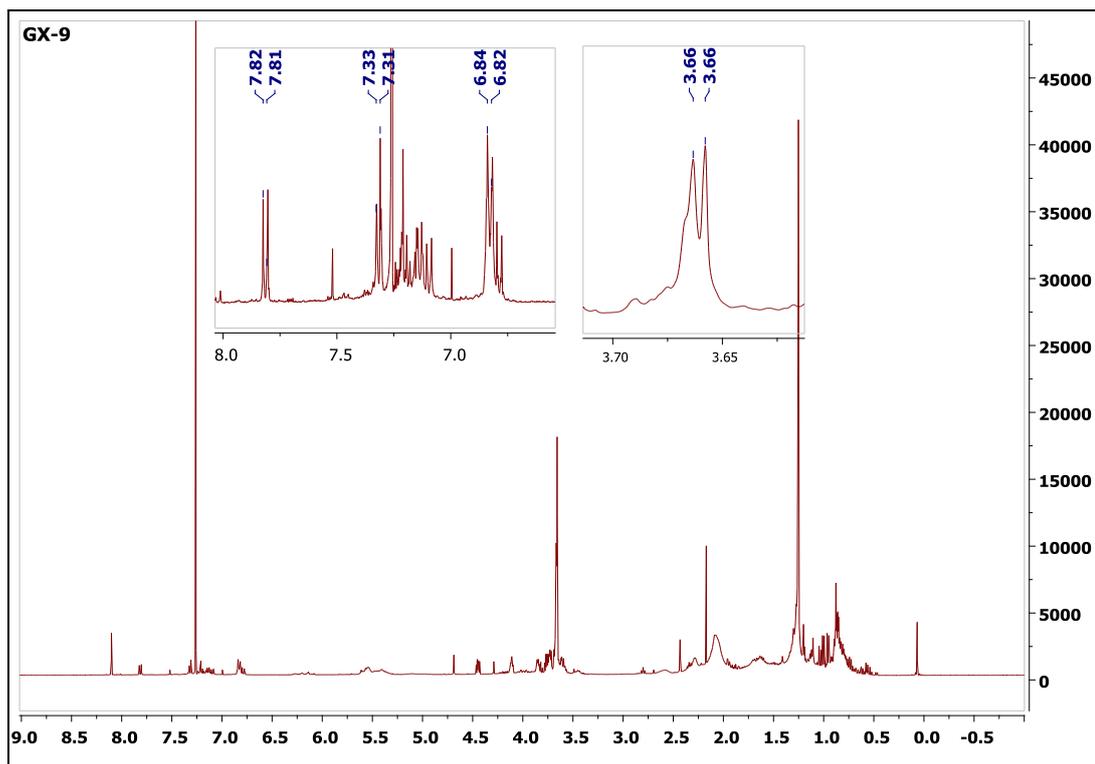


Figura 14. Espectro de Resonancia de Protón (400 MHz), de las fracciones 53 a 86, en Cloroformo-d

Fuente: Autora

3.6. Actividad antimicrobiana del extracto MJG- 7

La actividad del extracto total fue analizada por el método de Microdilución en Caldo contra bacterias y hongos dermatofitos. Se observó una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 500 µg/mL frente a *Enterococcus faecalis* (Ef), *Trichophyton mentagrophytes* (Tm) y *Trichophyton rubrum* (Tr), siendo considerada buena actividad cuando la CMI es ≤ 100 µg/mL según Cos et al, (2006) y Holetz et al (2002). Igualmente se realizó el estudio sobre las fracciones obtenidas sin mostrar actividad alguna contra estos microorganismos, descartando la capacidad inhibitoria del extracto frente a bacterias y hongos.

Estudios llevados a cabo por León et al, (2007) sobre 62 actinomicetos aislados de sedimento marino de la costa central peruana demostraron fuerte actividad inhibitoria siendo los géneros *Streptomyces* y *Thermoactinomyces* los que exhibieron mayor actividad frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*.

Del género *Streptomyces* se han aislado algunos metabolitos bioactivos como: Chalcomicina, un macrólido de 16 miembros que inhibe la síntesis de proteínas en la línea

celular de carcinoma de cuello uterino (HeLa), producido por una cepa de *Streptomyces* sp M491 aislada de la costa de Qingdao (China) Además, la Chalcomicina se reporta como metabolito procedente de una cepa de *Streptomyces* (B7064) recolectada en sedimentos marinos en Hawaii. (Olano et al, 2009). Se han descrito otros metabolitos bioactivos producidos por este género, entre ellos: 2-Aliloxifenol un antimicrobiano y antioxidante, la Carboxamicina un benzoxazol con potencial antibacterial y citotóxico, las Ciclomarinas (péptidos cíclicos) con actividad antiinflamatoria, y Enterocinas un policétido bacteriostático; estos metabolitos han sido aislados de algunas especies del género *Streptomyces*, de distintos sedimentos marinos como el mar de Japón, océano Atlántico, Hawaii etc., (Zotchev, 2012).

El ácido aureólico, uno de los metabolitos bioactivos más importantes con actividad antitumoral, aislado anteriormente en ecosistemas terrestres, se encontró en sedimentos marinos en Bijituan, China (Lu et al, 2012) en donde se realizaron estudios de actividad citotóxica frente a las líneas celulares SGC7901, HepG2, A549, HCT116, COC1 y HUVEC demostrando toxicidad significativa. Se aisló también este metabolito en otros estudios realizados por Hu et al, (2001) en un lago hipersalino en el este de las islas Plana Cays, Bahamas.

CONCLUSIONES

- El ADNr para la región 16S permitió la obtención de una secuencia con una longitud de 1100 pares de bases y se logró una comparación filogenética hasta nivel de género ubicando la cepa bacteriana MJG-7 dentro del género *Streptomyces*
- Se obtuvo un bajo rendimiento en la obtención del extracto de la cepa de *Streptomyces* sp. al emplear Acetato de Etilo como disolvente de extracción y resina de adsorción XAD-7HP, procedimiento consistente con un proceso de fermentación y de extracción en bacterias marinas
- Se obtuvieron 146 fracciones durante el procedimiento cromatográfico, sin embargo, no fue posible el aislamiento y purificación de metabolitos secundarios de esta cepa, debido a la complejidad del extracto, el bajo rendimiento obtenido y el soporte cromatográfico empleado.
- El extracto total analizado por el método de Microdilución en Caldo presentó una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 500 µg/mL frente a *Enterococcus faecalis* (Ef), *Trichophyton mentagrophytes* (Tm) y *Trichophyton rubrum* (Tr), siendo esta actividad débil descartando un estudio posterior frente este tipo de sistema microbiano ensayado.
- Ninguna de las fracciones obtenidas manifestaron actividad antimicrobiana a la dosis más alta probada en el ensayo.
- A través el análisis en CG-EM se identificaron dos metabolitos: Parasitol y Bis (2-etilhexil)ftalato, siendo este último reportado dentro del género *Streptomyces*.
- El análisis de Resonancia magnética nuclear de protón (RMN ¹H) permitió obtener un perfil general del tipo de metabolitos presentes en las fracciones obtenidas a pesar de la complejidad de las mismas.

RECOMENDACIONES

- A futuro hacer otros screening *in vitro* debido a que no se descarta la posibilidad que el extracto total y sus fracciones manifiesten actividad biológica en otros sistemas.
- Se debería iniciar el estudio de fraccionamiento con una mayor cantidad de extracto; así como la utilización de nuevos soportes cromatográficos para el aislamiento de metabolitos a partir de este tipo de microorganismos.
- Probar nuevas condiciones de cultivo para obtener una mayor producción metabólica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bérdy, J. (2006). Bioactive Microbial Metabolites. *Jpn. J. Antibiot.*, 58(1) 1-26.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI. (2002) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, in Approved Standard-Second Edition Method M38-A2, Wayne Ed. p. 1-27.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI. (2006) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically, in Approved Standard-Seventh Edition, Wayne Ed. p. 1-4.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI. (2011) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing], in Twenty first Informational supplement, Wayne Ed. p. 1-165.
- Cos P, Vlientinck A, Berghe D, Maes L. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *J. Ethnopharmacol*, 106, 290-302.
- Chun, J., Lee, J., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B., & Lim, Y. (2007). Ez Taxón: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J Syst. Evol.*, 57, 2259-2261.
- Demain, A L. & Sanchez, S. (2009) Microbial drug discovery: 80 years of progress. *Jpn. J. Antibiot*, 62(1), 5–16.
- Desplazamiento químico de protones. *Chemical Shift* (s.f.) Recuperado de: <http://www2.hesston.edu/Physics/NMR/chemicalshift.htm>
- Dhruvi, B. (2012). Molecular identification of bacteria using 16 S rDNA sequencing. (Tesis de Maestría, Universidad de Guajart). Recuperado de: http://www.researchgate.net/publication/235411237_MOLECULAR_IDENTIFICATION_OF_BACTERIA_USING_16S_rDNA_SEQUENCING
- Donadio, S., Maffioli, S., Monciardini, P., Sosio, M. & Jebes, D. (2010). Antibiotic discovery in the twenty-first century: current trends and future perspectives. *Jpn. J. Antibiot*, 63(8), 423–30.
- El-Sayed, M. (2013). Di-(2 ethylhexyl)Phtalate, A Major Bioactive Metabolite with antimicrobial and Citotoxic Activity Isolated from de Culture Filtrate of Newly isolated Soil *Streptomyces* (*Streptomyces mirabilis*, NS Qu-25). *World Applied Sciences Journal*, 21 (4), 465-475.
- Espectrometría de Masas. (s.f.). Recuperado de: http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES//investigacion/cromatografia/espectrometria_de_masas.pdf
- Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear. (s.f.) Recuperado de: <http://www.sinorg.uji.es/Docencia/FUNDQO/TEMA10FQO.pdf>
- Fenical, W. & Jensen, P. (2006). Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nat. Chem.*, 2(12), 666–73.

- Franco Correa, M. (2008). *Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas*. (Tesis doctoral, Universidad de Granada). Recuperado de: <http://hera.ugr.es/tesisugr/17716093.pdf>.
- Harvey, D. (2002). *Química Analítica Moderna*. España. McGraw Hill.
- Herrera, J. (2003). Filogenia bacteriana mediante el análisis del rRNA 16 S. México. Recuperado de: <http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Departamentos/Samp/Microbiologia/filogenetica.pdf>
- Hesse, M., Meier, H. & Zeeh B. (2005). *Métodos Espectroscópicos en Química Orgánica*. España. Editorial síntesis. Pag. 243.
- Holetz F, Pessini G, Sanches N, Cortez D, Nakamura C, Filho B. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 97(7), 1027–31.
- Hu, Y., Espíndola, A., Stewart, N., Wei, N., Posner, B. & MacMillan, J. (2011). Chromomycin SA analogs from a marine-derived *Streptomyces* sp. *Bioorgan. Med. Chem.*, 19, 5183-5189
- Introducción a la Cromatografía. (2011). *En Open Course Ware*. Recuperado de: http://ocw.uv.es/ocw-formacio-permanent/2011-1-35_Manual.pdf
- Lu, J., Ma, Y., Liang, J. Xing, Y., Xi, T. & Lu, Y. (2012). Aureolic acids from a marine-derived *Streptomyces* sp. WBF16. *Microbiol Res*, 157, 590-595.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 115-175
- Leiva, S., Yañez, M., Zaror, L., Rodríguez, H. & García, H. (2004). Actividad antimicrobiana de Actinomycetales aislados desde ambientes acuáticos de sur de Chile. *Rev. Med*, 132, 151-159.
- León, J., Liza, L., Soto, I., Cuadra, L., Patiño, L., Zerpa, R. (2007) Actinomycetes bioactivos de sedimento marino de la costa central del Perú. *Rev. Perú. Biol*, 14, 259-270.
- Mateos, P. (2006). Producción industrial de metabolitos secundarios, Recuperado de: <http://darwin.usal.es/profesores/pfmq/sefin/MI/tema08MI.html>
- Martinez, Z. & Moreno, A. (2007). Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producida por actinomicetos. *BioTecnología*, 11 (3), 37-50.
- Microbiología de Actinomicetos. (2012). *En Microbe Beta World*. Recuperado de: <http://www.microbeworld.org/component/jlibrary/?view=article&id=9682>
- Mikes, O. (1979). *Laboratory Handbook of Chromatographic and allied methods*. England. Ellis Horwood.
- Olano, C., Méndez, C. & Salas, J. (2009). Antitumor Compounds from Marine Actinomycetes. *Mar. Drugs*, 7, 210-48

- Praven, V. & Tripathi, C. (2009). Studies on the production of actinomycin-D by *Streptomyces griseoruber*- a novel source. *Lett. Appl. Microbiol*, 49, 450-455.
- Quizhpe, A., Murray, M., Muñoz, G., Peralta, J., & Calle, K. (2011). Recuperar la salud integral y la armonía de los ecosistemas, para contener la Resistencia bacteriana a los antibióticos. *ReAct Latinoamérica*, 15.
- Red Nacional de Vigilancia de Resistencia Bacteriana Ecuador (REDNARBEC). Reporte de Resistencias Bacterianas para el año 2008. Recuperado de: www.rednarbec.org
- Rodicio, R. & Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación de I ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Universidad de Obviedo, España. 1–7.
- Salazar, A. & Ordoñez, C. (2013). *Aislamiento e identificación de Actinomicetos fijadores de nitrógeno en suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira*. (Tesis de Químico Industrial, Universidad de Pereira). Recuperado de: <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/3050/1/58073S161.pdf>.
- Sivakumar, K. (s.f.). Actinomycetes. Recuperado de: <http://ocw.unu.edu/international-network-on-water-environment-and-health/unu-inweh-course-1-mangroves/actinomycetes.pdf>.
- Stackebrandt, E., Rainey, F. & Ward-Rained. (1997). Proposal for a New Hierarchic Classification System, Actinobacteria classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 47(2), 479-491
- Stubblefield, R., Shotwell, O., Shannon, G., Weisleder, D. & Rohwedder, W. (1970). Parasiticol: A New Metabolite from *Aspergillus parasiticus*. *J. Agr.*, 18 (3), 391-397.
- Sylvia D Principles and applications of soil microbiology, Pearson /Prentice Hall, Segunda Edición: New Jersey, 2005, 259-306.
- Técnicas Cromatográficas. (s.f.). *Universidad Autónoma de México*. Obtenido de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf
- Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P.W., and Palmer, J.D. 1999. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J. Euk. Microbiol*, 46: 327–338.
- Zaitlin, B.; Watson, S.; Ridal, J.; Satchwill, T.; Parkinson, D Actinomycetes in Lake Ontario: habitats and geosmin and MIB production. *J. AWWA*. 2003, 95, 113-118.
- Zotchev, S. (2012). Marine actinomycetes as an emergin resource for the drug development pipelines. *J. Biotechnol*, 158, 168-175

ANEXOS

ANEXO 1 MEDIOS DE CULTIVO PARA ACTINOMICETOS SUPLEMENTADOS CON AGUA DE MAR ARTIFICIAL

A. Fórmula para el agua de mar artificial: 10 Litros

Solución 1 (disolver en 8 L)

NaCl	211,90 g
Na ₂ SO ₄	35,5 g
KCl	5,99 g
NaHCO ₃	1,74 g
KBr	0,863 g
Ácido Bórico	0,230 g
NaF	0,028 g

Solución 2 (disolver en 1,93 L)

MgCl ₂ .6H ₂ O	95,92 g
CaCl ₂ .6H ₂ O	13,44 g
SrCl ₂ .H ₂ O	0,218 g

Nutriente 1 (añadir 10 mL de la solución stock)

NaNO ₃	46,70 g en 1L H ₂ O
-------------------	--------------------------------

Nutriente 2 (añadir 10 mL de la solución stock)

NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	3,09 g en 1L H ₂ O
--	-------------------------------

Solución Metales Stock 1-Hierro (añadir 10 mL de la solución stock)

FeCl ₃ .6H ₂ O	1,77 g en 1L H ₂ O
Na ₂ EDTA.2 H ₂ O	3,09 g

Solución Metales Stock 2- Metales Trazas (añadir 10 mL de la solución stock)

ZnSO ₄ .7 H ₂ O	0,073 g en 1L H ₂ O
CoSO ₄ .7H ₂ O	0,016 g
MnSO ₄ .2H ₂ O	0,054 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1,48 mg
Na ₂ SeO ₃	0,0173 mg
NiCl ₂ . 6H ₂ O	1,49 mg
Na ₂ EDTA.2 H ₂ O	2,44 g

Stock de Vitaminas (añadir 10 mL de la solución stock)

Tiamina.clorhidrato	0,1 g en 1L H ₂ O
Biotina	2 mg
Vitamina B ₁₂	1 mg

B. Medio mínimo A1 (1L disolución)⁷

Almidón	10 g
Ext. Levadura	4 g
Peptona	2 g
CaCO ₃	1 g
Agua de mar artificial	%
Agua destilada	%

Suplementado

Fe ₂ (SO ₄) ₃	5 mL/L u 8 g/L
KBr	5 mL/L u 8 g/L

C. Medio Acídico Gauze (1L disolución)¹

Almidón	20 g
NaNO ₃	1 g
MgSO ₄	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
Agua de mar artificial%	
Agua destilada	%

Suplementado

Glucosa	2 g
Ext. Levadura	3 g

⁷ Para preparar placas de medio sólido a la formulación se le añaden 15 g de Agar bacteriológico por litro de disolución

D. Medio YMA (Agar Levadura Malta, 1L disolución)

Ext. Malta	1 g
Ext. Levadura	0,4 g
Dextrosa	0,4 g
Agar bacteriológico	15 g

**ANEXO 2. SECUENCIA DE LA CEPA MJG-7 AISLADA MEDIANTE ANÁLISIS DE ADNr
16S**

TCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGACCAGCCA
GGGCATCTTTGAGGGTCGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCCGCGC
CTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGC
CGGCCTGAGAGGGGGACCGACAACTGAGACTGAGACACGGCCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAATGTGGAATATTGCACAATGCGCGAGAGCCTGAT
GCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTC
AGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGGCGGCTAA
CTACGTGCCAGCAGCAGCGGTAATACGTATGGCGCAAGCGTTGTCGGGAA
TTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCTGCTTGTACGACGGCAGTGAAAG
CCCCGCGGTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACAGGCAGGCTAGAGTTGG
GTAGGTCAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGATATGCGCAGATCTAAG
GAGGAAGATGGGTAGCGAAGGTGGATCTCTGGGCCGATGCTGACGCTGAG
GAGCGAAAGCGTGGTGAGCGAACAGGATTATATATCCTGGTAGTCCACGT
CGTAAACGATAGGCGCTATGTGTGGGCGAGATTCCACGTTGTCTGCGCGC
ATCTCACGCATTCAGTGATTCCCATCTGAGTACGGCACTCTAGTCAGACT
CTAAGGAATTGACAGGGGCGCGCACAAAGCGGGGATCATGTGGCTAAATT
TCACGCCCCGCGCAAATCTTTACACGGCATTATTTCCGCCGGAGATTGC
GCGCGACGGGTCCCCCTGTGGTCGGAGTAAAGTGGCGGATGTTTTCTGC
AGGTCCGTCACTTTAAGTTCGGTCAAGTCCAAGAAGGTTACAACCCTTAG
GCCGTGTTCTACAAGGCCTTCTGCTTTTGGGTTTCCCCGTGAACGCCA
TGCCACTCGGGGGACGGGGGGAGGACGGCAGGGTTCAAGCCCCTATGGT
TGGGGGGCCCCCTAGCAAGATAGCCCGGTCAACCATGTTGGAACCTCCCT