



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS**



**BÚSQUEDA DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EN  
ACTINOBACTERIAS AISLADAS DE SEDIMENTOS  
MARINOS**

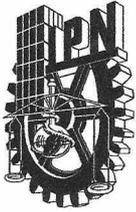
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS  
EN  
MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA

JUAN PABLO MAYO PEREZ

LA PAZ, B. C. S. JULIO DEL 2020



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:0 horas del día 25 del mes de Junio del 2020 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de: CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS para examinar la tesis titulada: "BÚSQUEDA DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EN ACTINOBACTERIAS AISLADAS DE SEDIMENTOS MARINOS" del (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	MAYO	Apellido Materno:	PEREZ	Nombre (s):	JUAN PABLO
-------------------	------	-------------------	-------	-------------	------------

Número de registro: A 1 8 0 4 8 6

Aspirante del Programa Académico de Posgrado: MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Una vez que se realizó un análisis de similitud de texto, utilizando el software antiplagio, se encontró que el trabajo de tesis tiene 9 % de similitud. **Se adjunta reporte de software utilizado.**

Después que esta Comisión revisó exhaustivamente el contenido, estructura, intención y ubicación de los textos de la tesis identificados como coincidentes con otros documentos, concluyó que en el presente trabajo SI  NO  **SE CONSTITUYE UN POSIBLE PLAGIO.**

#### JUSTIFICACIÓN DE LA CONCLUSIÓN:

Una vez analizado el resultado obtenido utilizando el software Turnitin, se consideró que el porcentaje de similitud es aceptable ya que se encuentra principalmente en el formato de la tesis (carátula, índice, glosario) y en oraciones cortas. Se determinó que las coincidencias son aceptables para establecer que no hay indicios de posible plagio.

\*\*Es responsabilidad del alumno como autor de la tesis la verificación antiplagio, y del Director o Directores de tesis el análisis del % de similitud para establecer el riesgo o la existencia de un posible plagio.

Finalmente y posterior a la lectura, revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR**  **SUSPENDER**  **NO APROBAR**  la tesis por **UNANIMIDAD**  o **MAYORÍA**  en virtud de los motivos siguientes:

**"SATISFACE LOS REQUISITOS SEÑALADOS POR LAS DISPOSICIONES REGLAMENTARIAS VIGENTES"**

#### COMISIÓN REVISORA DE TESIS

DRA. BÁRBARA GONZÁLEZ ACOSTA  
Director de Tesis  
Nombre completo y firma

DRA. AÍDA MARTÍNEZ LÓPEZ  
Nombre completo y firma

DR. MAURICIO MUÑOZ OCHOA  
Nombre completo y firma

DR. CÉSAR SALAZAR CARDONA FÉLIX  
2º Director de Tesis (en su caso)  
Nombre completo y firma

DR. JESÚS IVÁN MURILLO ÁLVAREZ  
Nombre completo y firma

DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO  
Nombre completo y firma  
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 19 del mes de Junio del año 2020

El (la) que suscribe MICROBIÓL. JUAN PABLO MAYO PEREZ Alumno (a) del Programa

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

con número de registro A180486 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DRA. BÁRBARA GONZÁLEZ ACOSTA Y DR. CÉSAR SALVADOR CARDONA FÉLIX

y cede los derechos del trabajo titulado:

“BÚSQUEDA DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EN ACTINOBACTERIAS AISLADAS DE  
SEDIMENTOS MARINOS”

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la

siguiente dirección: jmayo1990@gmail.com - bgonzal@ipn.mx - ccardona@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

*JM*

MICROBIÓL. JUAN PABLO MAYO PEREZ

Nombre y firma del alumno

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional (IPN-CICIMAR), bajo la dirección de la Dra. Bárbara González Acosta, Profesora-Investigadora del IPN-CICIMAR y del Dr. César Salvador Cardona Félix, Catedrático CONACyT comisionado al referido Centro de Investigación, con la asesoría de la Dra. Aída Martínez López, Dr. Mauricio Muñoz Ochoa y Dr. Iván Murillo Álvarez, todos Profesores-Investigadores del IPN-CICIMAR, en el período comprendido entre enero de 2018 a junio de 2020.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Instituto Politécnico Nacional y al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas por haberme brindado la posibilidad de realizar este posgrado.

Al CONACyT y al programa de Becas Institucional (BEIFI) por el apoyo económico otorgado durante mis estudios y a los proyectos SIP 20182192 y 20196320.

A todos los profesores de CICIMAR porque muchos fueron los que me aportaron elementos a favor de mi formación profesional.

A los profesores Dra. Bárbara González Acosta, Dr. Jesús Iván Murillo Álvarez y Dr. César Salvador Cardona Félix por su respaldo en el proceso de ingreso a los estudios de posgrado por su paciencia, apoyo y dedicación les agradezco infinitamente.

A los profesores Dra. Aída Martínez López y Dr. Mauricio Muñoz Ochoa, miembros del comité de tesis.

A mi familia y a mis amigos.

# ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	III
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	V
<b>GLOSARIO</b> .....	VI
<b>ABREVIATURAS</b> .....	IX
<b>RESUMEN</b> .....	X
<b>ABSTRACT</b> .....	XI
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.2 Amensalismo.....	1
1.3 Técnicas de antibiosis.....	1
1.1 Reseña histórica de antibiosis.....	2
1.4 Actinobacterias como fuente de sustancias bioactivas.....	3
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	5
2.1 ACTINOBACTERIAS MARINAS COMO FUENTE PROLÍFICA DE ANTIBIÓTICOS.....	5
2.2 Péptidos antimicrobianos.....	6
2.2.1 Péptidos antimicrobianos de origen ribosomal. ....	6
2.2.2. Péptidos antimicrobianos de origen no ribosomal.....	7
2.3. BIOPROSPECCIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS NO RIBOSOMALES.....	8
2.4. Péptidos antimicrobianos como alternativa a la multiresistencia.....	10
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	11
<b>HIPÓTESIS</b> .....	12
Objetivo General.....	13
Objetivos Específicos.....	13
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	14
3.1. Microorganismos empleados.....	14
3.2. Medios de cultivo.....	14
3.3. Detección de actividad antimicrobiana.....	15
3.3.1. Doble Capa.....	15
3.3.2. Prueba de antagonismo, segundo tamizaje.....	15
3.4. Obtención de los sobrenadantes de cultivos.....	16
3.5. Crecimiento sobre papel celofán.....	16
3.6. Obtención de los filtrados de cultivo.....	16
3.7. Ensayo de detección de actividad antimicrobiana en placa.....	16
3.8. Ensayo de dilución crítica y tratamiento con proteinasa K.....	17
3.9. Detección de bacteriocinas.....	17
3.9.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE).....	17
3.9.2. Autobiografía en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	18
3.10 Separación de los compuestos mediante intercambio iónico.....	18
3.11. Cromatografía en capa fina (TLC).....	19
3.11.1. TLC-bioutografía.....	19
3.11.2. TLC-semipreparativa.....	20
3.12. Caracterización Estructural.....	20
3.13. Detección a nivel de genoma de los genes codificantes de la sintetasa de péptidos no ribosomales e Identificación molecular.....	21
3.13.1. Aislamiento del ADN.....	21
3.13.2. Detección de la sintetasa de péptidos no ribosomales.....	21
3.13.3. Identificación taxonómica.....	22
3.13.4. Secuenciación e identificación.....	22

3.14. Caracterización bioquímica.....	23
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
4.1. Detección de actividad antimicrobiana mediante el método de doble capa.....	24
4.2. Prueba de antagonismo, segundo tamizaje.....	24
4.3. Ensayo de detección de actividad antimicrobiana para el sobrenadante.....	26
4.4. Productos extracelulares obtenidos mediante membrana de celofán.....	27
4.5. Ensayo de dilución crítica y tratamiento con proteinasa K.....	27
4.6. Detección de péptidos antimicrobianos. Autobiografía en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	30
4.6.1. Perfiles para compuestos de alto peso molecular (Glicina-SDS-PAGE).....	30
4.6.2. Perfil de compuestos de bajo peso molecular (Tricina-SDS-PAGE).....	32
4.7. Separación de los compuestos mediante intercambio iónico.....	35
4.8. Cromatografía en capa fina en gel de sílica y autobiografía TLC.....	36
4.8.1. TLC-semipreparativa.....	38
4.9. Caracterización estructural.....	39
4.10. Identificación taxonómica y de la NRPS.....	40
4.10.1. Identificación de la NRPS.....	40
4.10.2. Identificación taxonómica.....	42
4.11 Características morfológicas y bioquímicas.....	43
4.12. Compilación de resultados.....	46
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>48</b>
5.1. Detección de actividad antimicrobiana mediante el método de doble capa.....	48
5.2. Prueba de antagonismo, segundo tamizaje.....	48
5.3. Ensayo de dilución crítica y tratamiento con proteinasa K.....	50
5.4. Detección de péptidos antimicrobianos.....	52
5.4.1. Autobiografía en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	52
5.5. Purificación de los compuestos mediante intercambio iónico.....	52
5.6. Cromatografía en capa fina en placa de gel de sílica y autobiografía TLC.....	54
5.7. Caracterización estructural.....	56
5.8. Identificación taxonómica y de la NRPS.....	59
5.8.1. Identificación de la NRPS.....	59
5.8.2. Identificación taxonómica y caracterización bioquímica.....	61
5.9. Compilación y análisis de resultados.....	62
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>66</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>67</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>82</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Clasificación de los métodos microbiológicos de bioprospección para la detección de la actividad antimicrobiana según (Choma & Grzelak, 2010).....	2
<b>Figura 2.</b> Actividad antimicrobiana detectada mediante la metodología de doble capa para tres cepas de género <i>Streptomyces</i> sp representadas con los números 29, 65 y 66 frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	24
<b>Figura 3.</b> Actividad antagonista detectada mediante la siembra por contacto directo para cuatro cepas representadas con los números 29, 65, 66 y 32 frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923..	25
<b>Figura 4.</b> Prueba de antagonismo (duplicado) frente a <i>S. aureus</i> para 9 aislados del total de 75 cepas de actinobacterias evaluadas.....	26
<b>Figura 5.</b> (A) Actividad antimicrobiana del sobrenadante de cultivo de las cepas 29, 65 y 66 a los días de incubación 2 y 3. (B) Actividad inhibitoria de sobrenadante de cultivo de la cepa 29 a los 3, 4, 5 y 7 días (color azul) de incubación. Las placas se incubaron a 35°C durante 24 horas.....	27
<b>Figura 6.</b> Ensayo de dilución crítica para las cepas representadas con los números 29, 65 y 66. (+) Presencia de actividad antimicrobiana; (-) Ausencia de actividad antimicrobiana.....	28
<b>Figura 7.</b> Concentraciones de proteinasa K probadas (100 µg/mL, 400 µg/mL 1 mg/mL) para hidrolizar albúmina sérica bovina a una concentración de 0.5 mg/mL a dos temperaturas de digestión 37 y 55° C.....	29
<b>Figura 8.</b> Actividad antimicrobiana de los filtrados de cultivo luego de ser sometidos a un tratamiento con proteinasa K. (C): Filtrado de cultivo nativo. (1 y 2): Filtrado de cultivo tratado con proteinasa k.....	29
<b>Figura 9.</b> Perfil electroforético de alto peso molecular de los filtrados de cultivo obtenidos de la biomasa recuperada mediante la técnica de crecimiento sobre membrana de celofán para la muestra 29 (duplicado).....	30
<b>Figura 10.</b> Autobiografía de los compuestos extracelulares de la cepa 29.....	31
<b>Figura 11.</b> (A) Vista contraluz de la placa de bioautografía, en la misma se observan dos zonas de inhibición (1 y 2) del crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923. (B) Se observa con mayor resolución al modificar el contraste de la imagen original mostrada en la figura A.....	32
<b>Figura 12.</b> (A): Perfil electroforético Tricina-SDS-PAGE del sobrenadante de cultivo de la cepa 29, (M.P.D.) muestras parcialmente desnaturalizadas, (M.D.) muestras desnaturalizadas, (PM) marcador de bajo peso molecular con un intervalo de 1.7 a 40 kDa. Figura 10 B, bioautografía Tricina-SDS-PAGE.....	33
<b>Figura 13.</b> Electroforesis en geles de Tricina-SDS-PAGE de los productos extracelulares de la cepa 29.....	34
<b>Figura 14.</b> Bioautografía de los productos extracelulares de la cepa 29: (A y B) bandas de inhibición (1 y 2) obtenidas mediante el sistema Glicina-SDS-PAGE. (C) banda de inhibición (marcada con línea roja) como resultado de la bioautografía Tricina-SDS-PAGE de los productos extracelulares de la cepa .....	34
<b>Figura 15.</b> Halos de inhibición de las fracciones eluidas A y B.....	35

<b>Figura 16.</b> Bioautografía en placa fina del compuesto antimicrobiano producido por la cepa 29.....	36
<b>Figura 17.</b> Perfil cromatográfico de capa fina en una matriz de gel de sílica de 1.5 X 6 cm del filtrado de cultivo de la cepa 29.....	37
<b>Figura 18.</b> Contraste entre dos perfiles cromatograficos de la cepa 29. (A) observado bajo luz ultravioleta y (B): revelado con el reactivo ninhidrina.....	38
<b>Figura 19.</b> TLC-semipreparativa de los productos extracelulares de la cepa 29. Vista bajo luz ultravioleta $\lambda = 250 \text{ nm}$ 250 nm.....	38
<b>Figura 20.</b> Espectro infrarrojo medio del compuesto antimicrobiano producido por la cepa 29.....	39
<b>Figura 21.</b> Espectro de masas C1 Tr.-4.824, C2 Tr.-4.873, C3 Tr.-4.972, Tr.-5.105 min.....	40
<b>Figura 22.</b> Amplificación de ADN de actinobacterias con oligonucleótidos para genes NRPS. (A) Oligonucleótido A3F/A7R, amplicón de 750 pb correspondiente a las cepas representadas con los números 4, 5, 7,11, 32 y 47. M, marcador 3 Kb. (B) Oligonucleótido A2F/A3R amplicón de 300 pb correspondiente a las cepas representadas con los números cepas 7, 13, 28, 29 y 65 marcador3 Kb.	41
<b>Figura 23.</b> Características morfológicas de las cepas representadas con los números 29, 65 y 66. Esporas en forma de espiral (A).....	44
<b>Figura 24.</b> Perfil hemolítico de la cepa 29 crecida en agar sangre: (A) Vista bajo la incidencia directa de luz sobre las colonias celulares; (B) Vista a contraluz de las mismas colonias.....	46
<b>Figura 25.</b> Espectro infrarrojo medio del compuesto antimicrobiano producido por la cepa 29(rojo). Espectro infrarrojo medio del compuesto antimicrobiano (azul) reportado por Messaoudi et al. (2015).....	56
<b>Figura 26.</b> Espectro infrarrojo medio para el dendrímero PAMAM reportado por Orocio, 2013.....	57

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Comparación de la secuencia NRPS de la cepa respecto a las reportadas en el NCBI.....	42
<b>Tabla 2.</b> Identificación taxonómica de 16 cepas de actinobacterias marinas catalogadas como fuentes promisorias de compuestos antimicrobianos y seleccionadas a partir de un banco constituido por 75 cepas.....	43
<b>Tabla 3.</b> Pruebas bioquímicas efectuadas para las cepas 29, 65 y 66.....	45
<b>Tabla 4.</b> Potencial antimicrobiano de 12 cepas de actinobacterias marinas catalogadas como fuentes promisorias de compuestos antimicrobianos y seleccionadas a partir de un banco constituido por 75 cepas.....	47

## GLOSARIO

**Antibiosis:** Proceso de relación letal entre microorganismos, la cual no implica que estén en contacto directo.

**Antagonismo:** Proceso de relación letal entre microorganismos, es preciso que ambas poblaciones microbianas se pongan en contacto.

**Autobiografía:** Método para la detección de la actividad antimicrobiana. Inicialmente los compuestos son separados en una matriz y se transfiere a un medio de cultivo con base de agar que sirve como sustrato para el crecimiento del microorganismo.

**Alineamiento de secuencias:** Procedimiento bioinformático que sirve para representar y comparar dos o más secuencias o cadenas de ADN, ARN o proteínas, para resaltar su porcentaje de similitud, el cual podrían indicar relaciones funcionales o evolutivas entre los genes o proteínas.

**Antibióticos:** Sustancia química producida por un ser vivo u obtenida de forma sintética que mata o inhibe el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles.

**Bacteriocina:** Péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal.

**BLAST:** Por sus siglas en inglés, *Basic Local Alignment Search Tool*. Es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN, ARN o de proteínas. El programa es capaz de comparar una secuencia problema contra las secuencias disponibles en una base de datos.

**Cepa:** En microbiología, población de microorganismos de una sola especie que poseen la misma composición genética.

**Compuesto bioactivo:** Metabolito que tiene algún efecto sobre un organismo vivo, tejido o célula.

**Cromatografía en placa fina:** Técnica cromatográfica que emplea una fase estacionaria polar (más usada, sílica gel) adherida a una placa de vidrio, aluminio u otro soporte. Esta placa se coloca inmersa verticalmente en una fase móvil (eluyente).

**Desnaturalización:** Cambio estructural que sufre una biomolécula donde pierde su estructura nativa y usualmente, su óptimo funcionamiento.

**Electroforesis:** Técnica para la separación de moléculas según su movilidad en un campo eléctrico. Dependiendo de la técnica, la separación obedece en distinta medida a la carga eléctrica de las moléculas y a su masa.

**Espectro de infrarrojo:** Gráfico que muestra la absorbancia (transmitancia) de luz infrarroja en función de la frecuencia o la longitud de onda.

**Farmacología:** Ciencia que estudia el origen, las acciones y las propiedades que las sustancias químicas ejercen sobre los organismos vivos.

**Genbank:** Base de datos de secuencias genéticas del NIH (*National Institutes of Health* de los Estados Unidos), de disponibilidad pública.

**Halo de inhibición:** Zona alrededor del área impregnada con la sustancia activa en la que no se produce crecimiento bacteriano.

**Hospedero:** Organismo que alberga a otro en su interior o lo porta sobre sí mismo.

**Gram-positiva:** Célula procariota cuya pared celular está compuesta básicamente por peptidoglicano y que carece de membrana externa.

**Gram-negativa:** Célula procariota cuya pared celular contiene relativamente poco peptidoglicano y presenta una membrana externa compuesta por lipopolisacárido, lipoproteína y otras macromoléculas complejas.

**Metabolito secundario:** Compuesto orgánico sintetizado por el organismo que no tiene un rol directo en el crecimiento o reproducción de éste, pero que pueden brindar ventaja competitiva.

**Proteinasa K:** Proteasa de amplio espectro de acción enzimática.

**Oligonucleótido:** Secuencia corta de ADN o ARN, con cincuenta pares de bases o menos utilizados con diversos fines. Uno de ellos como iniciador en reacciones de amplificación.

**Secuenciación:** Conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en una cadena de ADN.

**Sintetasa de péptidos no ribosomal SPNR:** Complejo enzimático independiente del ARN mensajero que lleva a cabo la síntesis de péptidos denominados no ribosomales.

**Taq polimerasa:** Enzima termoestable del metabolismo de ácidos nucleicos aislada de *Thermus aquaticus* (Taq), una bacteria que soporta altas temperaturas.

## ABREVIATURAS

ATCC	Del inglés <i>American Type Culture Collection</i>
BSA	Albúmina de suero bovino
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
TLC	Cromatografía en capa fina
UV	Luz ultravioleta
VIS	Luz visible
NRPS	Sintetasa de péptido no ribosomal
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
Regulador TE	Regulador Tris-EDTA
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
dNTP's	Desoxirribonucleótido trifosfato
LB	Colorante de carga (del inglés <i>loading buffer</i> )
NCBI	Del inglés <i>National Center for Biotechnology Information</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
TBE	Solución amortiguadora tris-ácido bórico-EDTA
TSA	Agar soya tripticasa
TE	Tris EDTA

## RESUMEN

En la actualidad los sedimentos de ambientes marinos son de interés para los programas de bioprospección, siendo una fuente abundante de actinobacterias, las cuales tienen un alto potencial para la producción de nuevos compuestos con aplicaciones biotecnológicas. En el presente estudio se emplearon 75 cepas de actinobacterias aisladas de sedimento marino de la Bahía de la Paz, Baja California Sur, con el objetivo de evaluar su potencial para producir péptidos antimicrobianos. La actividad antimicrobiana se evaluó utilizando medio de cultivo sólido mediante los métodos de doble capa y contacto directo. Basados en estas pruebas se seleccionaron 8 cepas bioactivas. Diez cepas mostraron genes asociados con la biosíntesis de sintetetas de péptidos no ribosomales (NRPS). Se eligieron 16 cepas positivas para las pruebas de doble capa, contacto directo y la presencia de NRPS. Sin embargo, sólo una cepa representada con el número 29 produjo un posible péptido antimicrobiano sensible al tratamiento con proteínasa K y con acción inhibitoria frente a microorganismos Gram-positivos. Mediante bioautografía de TLC y de SDS-PAGE no se observó una relación entre los perfiles peptídicos y la actividad antimicrobiana. La caracterización estructural del extracto antimicrobiano de la cepa 29 mostró que el mismo consiste en una mezcla de 4 compuestos con la presencia de Dinactin y algunos de sus derivados sin descartar la posibilidad de que la mezcla contenga algún péptido. Finalmente se identificaron las 16 cepas seleccionadas mediante secuenciación del gen 16S del ARNr. El género más representado es *Streptomyces* sp. con un 75%. La presente experiencia constituye una rápida estrategia de bioprospección para el hallazgo de nuevos péptidos antimicrobianos.

Palabras claves: Bioprospección, sintetetas de péptidos no ribosomales (NRPS), Bioautografía- TLC y SDS-PAGE.

## **ABSTRACT**

Sediments are an abundant source of actinobacteria, which have a high potential to produce new compounds with biotechnological applications. Therefore, currently, they are of interest for bioprospecting programs. In this study, 75 strains of actinobacteria isolated from marine sediment from La Paz Bay, Baja California Sur, Mexico, were used, with the objective of evaluating their potential to produce antimicrobial peptides. The antimicrobial activity was evaluated in solid culture medium by the double layer and direct contact methods. Based on these tests, 8 bioactive strains were selected; 10 strains showed genes associated with biosynthesis of non-ribosomal peptide synthetases (NRPS); and 16 positive strains were chosen for another three tests: double layer, direct contact and the presence of NRPS. However, only one strain represented with the number 29 produced a possible antimicrobial peptide sensitive to proteinase K treatment and with inhibitory action against Gram-positive microorganisms. Using TLC and SDS-PAGE bioautography, no relation was observed between peptide profiles and antimicrobial activity. The structural characterization of the antimicrobial extract of strain 29 showed that it consists of a mixture of 4 compounds with the presence of Dinactin and some of its derivatives without ruling out the possibility that the mixture contains some peptide. Finally, the 16 selected strains were identified by sequencing of the 16S rRNA gene. The most represented genus is *Streptomyces* sp. with 75%. The present experience constitutes a rapid bioprospecting strategy that leads to discover new antimicrobial peptides.

**Keywords:** Bioprospecting, non-ribosomal peptide synthetases (NRPS), TLC-bioautography, SDS-PAGE

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Reseña histórica de antibiosis

Los antibióticos y antifúngicos son compuestos con actividad antiinfecciosa de importancia farmacológica, los cuales exponen un fundamento ecológico basado en la antibiosis (Segarra, 1997), la cual es un tipo de amensalismo. Los estudios sobre el amensalismo entre bacterias cobraron un gran impulso cuando a finales de siglo XIX se sugirió y posteriormente se demostró que el poder inhibitorio de *Pseudomonas fluorescens*, era debido a la existencia de una sustancia responsable del antagonismo. Este notable hallazgo derivó en el primer fármaco antibacteriano de uso terapéutico y fue llamado piocianasa con capacidad de inhibir el crecimiento de varios patógenos (Ledermann, 2013). Esta experiencia y muchas otras demostraron la existencia del fenómeno de la antibiosis, pero el término para nombrarlo fue planteado en el año 1889 planteado por Paul Vuillemin (Asusheyi *et al.*, 2012). Sin embargo, el fenómeno no tuvo repercusión práctica hasta el año 1928 con el descubrimiento de la penicilina que dio inicio a la antibióticoterapia (Tortora *et al.*, 2001).

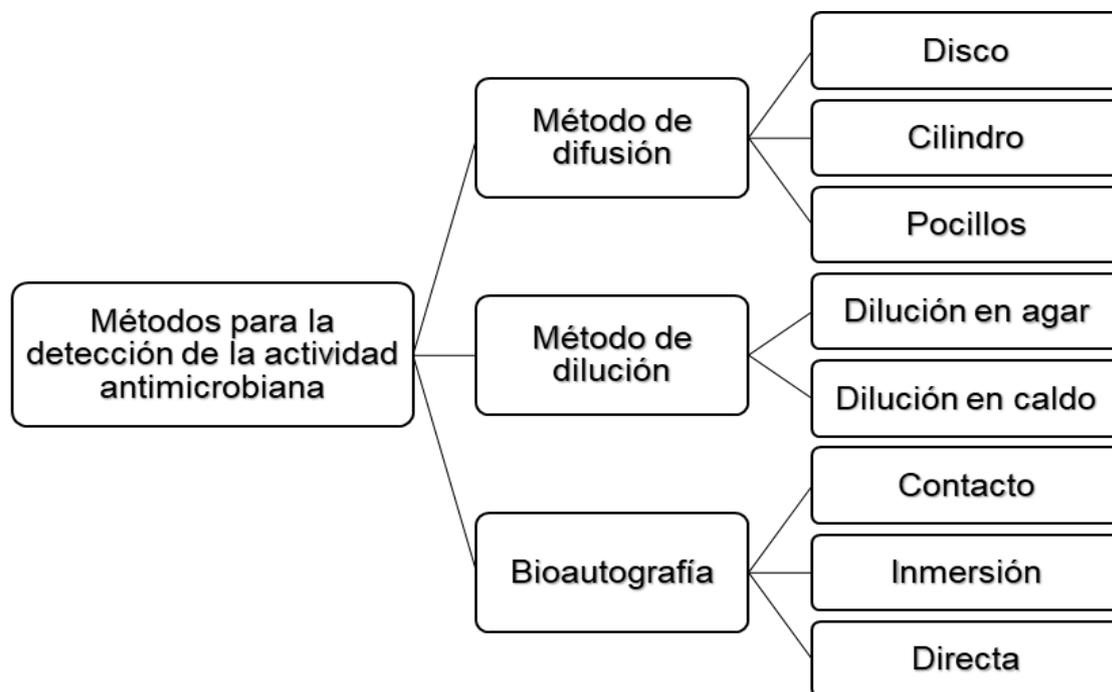
## 1.2. Amensalismo

El amensalismo es la interacción biológica entre dos microorganismos que se produce cuando uno de ellos se ve perjudicado y el otro no experimenta ninguna alteración, es decir, la relación le resulta neutra (García & Picazo, 1996). Una especie microbiana produce sustancias inhibitoras o tóxicas para otras especies como compuestos inorgánicos (ejemplo: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), compuestos orgánicos (ejemplo: ácidos y alcoholes) e inhibidores orgánicos de acción específica (ejemplo: bacteriocinas y toxinas). Sin embargo, es frecuente la aparición de resistencias entre las especies sensibles, quienes mutan a nivel de genoma y modifican su bioquímica de modo que el antibiótico no reconoce los sitios de unión o sintetizan enzimas que rompen o desnaturalizan el antibiótico. Estas sustancias inhibitoras o tóxicas pueden actuar como controles biológicos al ser secretadas al medio externo, previendo la colonización de otras especies (Lemos *et al.*, 1991). Dentro de una población sus miembros presentan muchas interacciones positivas y negativas, denominadas interacciones intraespecíficas. Además, dentro de la comunidad microbiana, las diferentes poblaciones interactúan entre sí, a lo cual se

les denomina interacciones interespecíficas. Estas últimas se pueden dividir en: a) interacciones positivas (comensalismo, sinergismo y mutualismo); b) positivas para una población y negativas para la otra (parasitismo y depredación) y c) interacciones negativas como competencia y amensalismo o antagonismo (Smith, 2001). El antagonismo y la antibiosis son formas específicas de esta interacción. En el antagonismo es preciso que ambas poblaciones microbianas se pongan en contacto directo mientras que en la antibiosis no es preciso que las poblaciones microbianas estén en contacto. Usualmente la sustancia que produce la inhibición es un antibiótico (Ledermann, 2013).

### 1.3. Técnicas de antibiosis

Desde hace décadas se han desarrollado múltiples técnicas para evaluar la antibiosis con base en la detección de la actividad antimicrobiana los microorganismos, extractos crudos libres de células y fracciones de productos puros capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos sensibles (Choma & Grzelak, 2010).



**Figura 1.** Clasificación de los métodos microbiológicos de bioprospección para la detección de la actividad antimicrobiana según (Choma & Grzelak, 2010).

Como se observa en la **figura 1**, para evaluar la actividad antimicrobiana se indican los métodos de enfrentamiento simultáneo en medio sólido (Barja, 1979) y de contacto directo (Gautier, 1976). La detección de actividad antimicrobiana de

extractos crudos y productos puros se realiza a través de la técnica de pocillos (Barja, 1979), el método de dilución (Hatalin, 1973) y de discos de papel filtro (Baver, 1966). Además, es de destacar el método de bioautografía como una forma simple, reproducible y altamente sensible para la detección de compuestos biológicamente activos (Wagman & Bailey, 1969). La bioautografía es un método muy similar a los procedimientos que se basan en la difusión en agar. La diferencia principal radica en que mediante la bioautografía los compuestos difunden de una matriz (en la que previamente fueron separados) a un medio con base de agar que sirve como sustrato para el crecimiento microbiano (Choma & Grzelak, 2010).

#### **1.4. Actinobacterias como fuente de sustancias bioactivas**

En la actualidad es muy importante el estudio de la microbiología marina para comprender las interacciones biológicas entre los microorganismos que habitan en estos ecosistemas (León *et al.*, 2011; Keller *et al.*, 2014). Una comprensión adecuada de la ecología microbiana marina ofrece la oportunidad de planificar estudios de bioprospección para descubrir las potencialidades de los microorganismos marinos con el fin de encontrar nuevos productos bioactivos (León *et al.*, 2011). Muchos microorganismos marinos que incluyen bacterias y hongos son considerados como fuentes promisorias de sustancias bioactivas (Keller *et al.*, 2014) y desde hace décadas autores como Barcina *et al.* (1987) demuestran la capacidad que tienen estos microorganismos para producir sustancias que inhiben el crecimiento de patógenos humanos. Se ha visto que los compuestos de origen marino generalmente son moléculas muy reactivas debido a que deben cumplir su acción biológica aun cuando se encuentran diluidas en los ambientes acuáticos (Glenroy *et al.*, 2007). Las diferentes funciones de los compuestos bioactivos marinos comprenden funciones como degradación de hidrocarburos, producción de tensoactivos y la producción de compuestos con actividad antitumoral y antimicrobiana entre muchas otras aplicaciones (Hernández *et al.*, 2018). Las actinobacterias destacan por constituir la mayor fuente de productos naturales bioactivos, así como por su distribución geográfica y diversidad taxonómica (Bull & Stach, 2007; Subramani & Aalbersberg, 2012). Muchos de los compuestos químicos de interés que producen son de naturaleza

peptídica, destacándose los péptidos antimicrobianos por su diversidad estructural y funcional (Hodges *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2017), cuya síntesis puede ser ribosomal (bacteriocinas) o no ribosomal sintetizados por enzimas denominadas sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS, *por sus siglas en inglés*) (Gotang *et al.*, 2010). En actinobacterias aisladas de ambientes marinos, los análisis de bioprospección, como el análisis de secuencias de las NRPS y técnicas de antibiosis para la detección de péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal (bacteriocinas) ofrecen una oportunidad para el descubrimiento y posterior desarrollo de nuevos compuestos con el fin de combatir microorganismos multirresistentes.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Actinobacterias marinas como fuente prolífica de antibióticos

Los actinomicetos son un grupo de microorganismos ampliamente distribuidos en ambientes terrestres, de agua dulce y marinos (Augustine *et al.*, 2013). Las actinobacterias son bacterias Gram-positivas filamentosas que pertenecen al orden *Actinomycetales*, se caracterizan por la producción de enzimas extracelulares y compuestos con actividad biológica que cumplen una función (mantenimiento, señalización y colonización) en el ecosistema microbiano (Fenical & Jensen, 2006; Augustine *et al.*, 2013). Las colonias de actinobacterias en medios de cultivo sólidos se comienzan a observar macroscópicamente adheridas al sustrato, luego de los 3 primeros días de incubación. Generalmente a partir de los 7 días de cultivo conforme se van agotando algunos de los nutrientes las colonias comienzan a desarrollar el micelio aéreo produciéndose la esporulación. Posteriormente se observan colonias de aspecto seco y pulverulento, las cuales presentan diferentes morfologías y colores. El micelio filamentosos es de diámetro menor al de los hongos y crecen en forma de red llamadas micelios, que pueden ser de dos tipos: micelio vegetativo y micelio aéreo (Jiménez, 2011). La escasez de algunos nutrientes y elevada densidad poblacional, constituyen señales que desencadenan la formación del micelio aéreo y posteriormente de las esporas por el desarrollo de tabiques en el extremo de los filamentos que constituyen el micelio aéreo (Prada, 2013).

Por otro lado, las actinobacterias son microorganismos considerados como unos de los mayores productores de sustancias antimicrobianas (Subramani & Aalbersberg, 2012; Subramani & Sipkema, 2019). Más de la mitad de los antibióticos utilizados actualmente son producidos por actinobacterias. Algunos ejemplos de estos compuestos son la estreptomycin, la tetraciclina, el cloranfenicol y la eritromicina (Fenical & Jensen, 2006). Aunque las actinobacterias han sido ampliamente estudiadas en el pasado, se estima que un bajo porcentaje de todo el potencial de los productos naturales incluso del género *Streptomyces* ha sido bien investigado (Watve, 2001), por tanto, existe una oportunidad considerable para nuevos descubrimientos. Además, las cepas derivadas de ambientes poco estudiados, incluido el sedimento marino han demostrado ser una fuente productiva de nuevos compuestos con alto potencial

biotecnológico (Magarvey, 2004; Fenical & Jensen, 2006; Bull & Stach, 2007), muchas de estas cepas pertenecen principalmente a dos familias: Streptomycetaceae y Micromonosporaceae (Magarvey *et al.*, 2004; Fenical & Jensen, 2006).

## **2.2. Péptidos antimicrobianos**

Muchos compuestos químicos de interés son de naturaleza peptídica, destacándose los péptidos antimicrobianos (AMP, *por sus siglas en inglés*) por su diversidad estructural y funcional, el mecanismo de acción de los AMP suele ser a través de la formación de poros destruyendo así la integridad de la membrana citoplasmática del patógeno (Shai, 2002). No obstante, otros péptidos antimicrobianos actúan inhibiendo enzimas o interrumpiendo procesos como la replicación del ADN o la transcripción (Brogden, 2005). Muchos AMP son susceptibles a la degradación proteolítica y una propiedad interesante de diversos AMP es su poca toxicidad hacia las células animales (Guina *et al.*, 2000).

### **2.2.1. Péptidos antimicrobianos de origen ribosomal**

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal producidos por microorganismos, principalmente del dominio bacteria (Gillor *et al.*, 2008). De modo general estos péptidos reconocen receptores específicos localizados únicamente en la bacteria blanco o en determinados grupos microbianos, por tanto, raramente presentan toxicidad sobre líneas celulares de origen animal (Riley & Wertz, 2002). Estas características destacan una potencial aplicación biotecnológica de las bacteriocinas como alternativa a los tratamientos con antibióticos tradicionales contra patógenos multirresistentes, o como conservadores en la industria alimenticia. Las bacteriocinas se clasifican en dos grandes grupos: las producidas por bacterias Gram-positivas y las producidas por bacterias Gram-negativas (Gillor *et al.*, 2008). Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas se dividen en cuatro clases diferentes. La clase I está compuesta por péptidos menores de 5 kDa que contienen los aminoácidos lantionina,  $\beta$ -metil-lantionina; ejemplos de bacteriocinas de esta clase son: nisina y lactocina S. Las bacteriocinas de clase II son péptidos catiónicos e hidrófobos de 20 a 60 aminoácidos de longitud y sin modificaciones postraduccionales (Héchard

& Sahl, 2002) y están divididas en tres subclases II a, II b y II c (Ennahar *et al.*, 2000). Aunque de modo general la clase II corresponde a péptidos menores a 10 kDa, termoestables que no contienen lantionina y cuyo mecanismo de acción se debe principalmente a la permeabilización de la membrana de la bacteria blanco. (Hécharad & Sahl, 2002; Gillor *et al.*, 2008). La clase III está constituida por proteínas termolábiles, mayores a 30 kDa y cuyo mecanismo de acción no se ha descrito completamente. La clase IV, agrupa a las bacteriocinas complejas constituidas por un elemento proteico más un motivo no proteico (Hécharad & Sahl, 2002). Las bacteriocinas producidas por actinobacterias generalmente son activas contra especies estrechamente relacionadas con la bacteria productora como michiganin A (Holtmark *et al.*, 2006). Aunque algunas de ellas tales como la microbisporicina poseen un amplio espectro de actividad inhibitorio sobre bacterias no relacionadas, otras tienen este efecto inhibitorio inclusive sobre protozoos (tiostrepton), levaduras (cinamicina) y virus (labyrinthopeptin A1 y duramycin) (Castiglione *et al.*, 2008; Aminake *et al.*, 2011; Ferir *et al.*, 2013; Richard *et al.*, 2015). Asimismo, algunas bacteriocinas producidas por actinobacterias y sus productos semisintéticos también muestran actividades antiinflamatorias, antialérgicas, antitumorales y regulan la presión arterial (Gomes *et al.*, 2017). Actualmente ya se dispone comercialmente de bacteriocinas producidas por actinobacterias con aplicaciones veterinarias como el ejemplo del tiostrepton utilizado en ungüento dermatológico para uso animal, mientras que otras se encuentran en desarrollo como NAI – 107, NAI-112 y lancovutida–duramicina (Gomes *et al.*, 2017). Estas evidencias avivan el interés por el potencial biotecnológico de bacteriocinas producidas por actinobacterias y principalmente de cepas aisladas de ambientes menos explorados con este fin, como el sedimento marino.

### **2.2.2. Péptidos antimicrobianos de origen no ribosomal**

Los péptidos no ribosomales son sintetizados por enzimas denominadas sintetetas de péptidos no ribosomales, las cuales no requieren del ARN mensajero (Ginolhac, 2004). Las sintetetas de péptidos no ribosomales son complejos multienzimáticos que catalizan la incorporación de aminoácidos en el péptido en crecimiento, los cuales constituyen diversas estructuras químicas (Tambadou *et al.*, 2014). Los módulos de NRPS son responsables de reacciones

como: la selección de aminoácidos, activación, unión, modificación alargamiento del péptido y liberación (Sieber & Marahiel, 2005; Shetty *et al.*, 2014). Es importante señalar que cada enzima es capaz de sintetizar únicamente un tipo de péptido. Los péptidos no ribosomales frecuentemente poseen una estructura cíclica y/o ramificada, pueden contener aminoácidos no proteinogénicos, incorporan modificaciones tales como grupos N-metilo y N-formilo, o se encuentran glicosilados, acetilados, halogenados, o hidroxilados (Passari *et al.*, 2015). El rango de actividades biológicas y farmacológicas de estos compuestos es extremadamente amplio. Actualmente se comercializan varios péptidos no ribosomales, producidos por actinobacterias, que incluyen antibióticos conocidos (gramicidina y vancomicina), agentes anticancerígenos (bleomicina), sideróforos (enterobactina y vibriobactina), inmunosupresores (ciclosporina A) y antiinflamatorios (Cane *et al.*, 1998; Cane & Walsh, 1999; Crosa & Walsh, 2002; Mansson *et al.*, 2011). Algunos ejemplos de péptidos antimicrobianos no ribosomales aislados exclusivamente de actinobacterias marinas son las marinomicinas A y D aisladas de cepas de *Marinophilus* sp. con actividad antitumoral y antibiótica; y el antibiótico abisomicina C obtenido a partir de cepas de *Verrucosispora* sp (Fenical & Jensen, 2006; Kwon *et al.*, 2006). El desarrollo evolutivo de relaciones de antagonismo de actinobacterias presentes en el sedimento marino podría involucrar nuevas secuencias NRPS (Mincer *et al.*, 2002; Bull *et al.*, 2005; Maldonado *et al.*, 2005).

### **2.3. Bioprospección de péptidos antimicrobianos no ribosomales**

El potencial biotecnológico de los péptidos antimicrobianos es un estímulo que impulsa el desarrollo de nuevas estrategias para minimizar el aislamiento de compuestos previamente descritos (Baltz, 2006). Con el propósito de identificar nuevas fuentes de péptidos antimicrobianos no ribosomales, se realizan diseños de oligonucleótidos para la amplificación de genes asociados con rutas de síntesis de NRPS en el ADN de muestras obtenidas de suelos (Ginolhac, 2004; Wawrik, 2005, 2007) y principalmente de bacterias Gram-positivas (Haydock 2004; Ayuso *et al.*, 2005; Ayuso & Genilloud, 2005; Kim *et al.*, 2006). Los análisis basados en la búsqueda de genes de las NRPS generan una oportunidad para predecir qué cepas tienen el mayor potencial para producir nuevos péptidos antimicrobianos no ribosomales (Ginolhac *et al.*, 2004). En el ambiente marino, los microorganismos

productores de péptidos antimicrobianos de origen no ribosomal más conocidos, forman parte de la microbiota asociada a esponjas (Maldonado *et al.*, 2009). Es de resaltar que, por el contrario, cepas aisladas de los sedimentos marinos no han sido examinadas exhaustivamente para detectar la presencia de nuevas NRPS (Maldonado *et al.*, 2009). En este contexto, algunas investigaciones dedicadas al estudio de NRPS en actinobacterias aisladas de sedimento marino, descubrieron nuevos grupos de genes relacionados con la síntesis de esta enzima (Gotang *et al.*, 2010; Hodges *et al.*, 2012). Una secuencia de NRPS de una cepa desconocida, con un alto nivel de identidad respecto a una secuencia de NRPS descrita anteriormente, puede ser utilizada para predecir si la cepa desconocida tiene el potencial genético para sintetizar péptidos no ribosomales (Kim *et al.*, 2006). Siguiendo esta estructura lógica, si la secuencia de NRPS desconocida muestra un bajo nivel de coincidencia respecto a vías caracterizadas previamente, se puede inferir que dicha secuencia está relacionada con la síntesis de péptidos no ribosomales que no han sido descritos anteriormente. En el caso de las bacteriocinas, algunas investigaciones también acuden a una bioprospección genética con capacidad predictiva buscando la presencia de genes relacionados con la síntesis de péptidos antimicrobianos ribosomales en el genoma bacteriano (Zhanget *al.*, 2003; Chen *et al.*, 2017). En la actualidad existen múltiples investigaciones que documentan cepas de actinobacterias de origen terrestre productoras de bacteriocinas potencialmente novedosas y con posibles aplicaciones biotecnológicas (Lee *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2019). No obstante, los reportes que informan sobre cepas de actinobacterias marinas productoras de bacteriocinas son escasos (Desriac *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2017) y resulta más interesante el hecho de no encontrar bibliografía que describa cepas marinas de *Streptomyces* sp productoras de estos compuestos. Por tanto, es plausible orientar una bioprospección para descubrir nuevas bacteriocinas producidas por actinobacterias marinas, mediante el uso de métodos convencionales de detección de actividad antimicrobiana justificando su uso debido a los reportes limitados en este sentido y a las potencialidades metabólicas de las actinobacterias aisladas de sedimento marino. Un estudio de bioprospección basado en las estrategias descritas anteriormente y su capacidad predictiva proporciona un método rápido para evitar el aislamiento de compuestos

conocidos y para identificar cepas de actinobacterias productoras de péptidos antimicrobianos potencialmente novedosos.

#### **2.4. Péptidos antimicrobianos como alternativa a la multirresistencia**

En las últimas décadas, el descubrimiento de nuevos fármacos se está apartado de los productos microbianos (Li & Vederas, 2009), debido a una disminución en el descubrimiento de nuevos metabolitos bioactivos (Baltz, 2005). Un problema para tener presente, si se considera el aumento en la aparición de multiresistencia en bacterias de importancia clínicas como: *Enterococco* resistente a vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Acinetobacter* spp, *Pseudomonas aeruginosa* resistente a los carbapenémicos y *Enterobacterias* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (Rice, 2008). Además, ha incrementado la multiresistencia en los hongos patógenos de humanos. Un ejemplo de ello es la resistencia de *Candida albicans* a los azoles (Diomedi, 2004). Actualmente estos microorganismos causan la mayoría de las infecciones hospitalarias en todo el mundo y “escapan” incluso a los efectos de los antimicrobianos más novedosos. Este grave problema vuelve obsoletos a muchos antibióticos que actualmente se encuentran en uso. El auge limitado de estrategias como la síntesis química y la combinación de antibióticos que constituyen alternativas al descubrimiento de compuestos naturales han apartado el interés por exploraciones basadas en la búsqueda de compuestos producidos por microorganismos (Pelaez, 2006). En este contexto es importante resaltar algunas características de los péptidos antimicrobianos como su baja toxicidad, así como su gran diversidad estructural y funcional (Guina *et al.*, 2000). Aplicando metodologías como el análisis de secuencias de las NRPS para descubrir nuevos péptidos antimicrobianos no ribosomales, así como técnicas de antibiosis para la detección de péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal, como las bacteriocinas, en actinobacterias aisladas de ambientes marinos, sin duda, ofrecen una oportunidad para dar salida a la necesidad de descubrir nuevos fármacos para combatir los microorganismos resistentes. Se enfatiza que el descubrimiento de nuevos péptidos antimicrobianos que inhiban dianas moleculares desconocidas puede ayudar a mitigar actualmente, al menos, a mediano plazo, los requerimientos de antimicrobianos.

## JUSTIFICACIÓN

Las actinobacterias representan un gran potencial en la búsqueda y descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos con relevancia biotecnológica. De estos, se destacan los péptidos antimicrobianos por su diversidad estructural y funcional. A partir de las actinobacterias terrestres se han aislado muchos antimicrobianos de origen peptídico; sin embargo, en los últimos años esa abundancia en el descubrimiento de estos metabolitos ha disminuido por lo que se ha visto la necesidad de explorar nuevos ambientes para su aislamiento. En este sentido, el sedimento marino representa un excelente medio para aislar actinobacterias potencialmente productoras de péptidos antimicrobianos novedosos. El potencial biotecnológico de los péptidos antimicrobianos cobra más importancia al ser un estímulo que impulsa los estudios de bioprospección para el desarrollo de nuevos compuestos con el fin de combatir los microorganismos clínicos multirresistentes. Este hecho constituye un incentivo para realizar un estudio de bioprospección con la finalidad de encontrar péptidos antimicrobianos producidos por actinobacterias aisladas de la Bahía de la Paz, Baja California Sur, con el propósito de determinar su posible potencial farmacológico. Tomando en cuenta lo antes mencionado, se formuló la siguiente pregunta:

¿Es posible encontrar péptidos antimicrobianos potencialmente novedosos y con posible uso farmacológico producidos por cepas de actinobacterias aisladas de sedimento marino?

## **HIPÓTESIS**

Las actinobacterias marinas representan una fuente de descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos con relevancia biotecnológica, destacándose los péptidos antimicrobianos por su diversidad estructural y funcional. Utilizando una estrategia de bioprospección basada en análisis de secuencias de la sintetasa de péptidos no ribosomales y en la detección de bacteriocinas mediante métodos químicos y enzimáticos, se logrará encontrar péptidos antimicrobianos potencialmente novedosos y con posible uso farmacológico producidos por cepas de actinobacterias aisladas de sedimento marino.

**Objetivo General:**

- Evaluar el potencial de actinobacterias marinas para la producción de péptidos antimicrobianos y su espectro inhibitorio frente a microorganismos de referencia y microorganismos de origen humano.

**Objetivos Específicos:**

1. Seleccionar las cepas con actividad inhibitoria frente a microorganismos de referencia y microorganismos de origen humano.
2. Asociar la acción de los péptidos como causa de la actividad antimicrobiana.
3. Seleccionar las cepas a través de la detección de bacteriocinas y de los genes de la sintetasa de péptidos no ribosomales (NRPS).
4. Identificar taxonómicamente las cepas bioactivas mediante secuenciación del gen 16S del ARNr.

### 3. MATERIALES y MÉTODOS

#### 3.1. Microorganismos empleados.

Actinobacterias marinas:

Setenta y cinco cepas de actinobacterias aisladas de sedimento marino de la Bahía de la Paz, B.C.S., fueron utilizadas para el desarrollo del trabajo. Todas las cepas forman parte de la colección de bacterias ambientales del laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (IPN-CICIMAR). Todas las cepas fueron aisladas utilizando dos medios de cultivo como base: agar marino (M1: 10 g de almidón soluble, 4 g de extractos de levadura, 2 g de peptona, 18 g de agar y 1 L H<sub>2</sub>O de mar artificial) y medio suplementado con arginina (M2: 6 mL de glicerol, 1 g arginina, 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 g MgSO<sub>4</sub>, 18 g de agar y 1 L H<sub>2</sub>O de mar artificial), a los medios se les adicionó cicloheximida (50 µg mL<sup>-1</sup>) y ácido nalidíxico (10 µg mL<sup>-1</sup>) (Mincer *et al.*, 2002), recomendado como medio selectivo para actinobacterias. En el presente trabajo las cepas son representadas con números arábigos en concordancia a la clave original del cepario (Anexo). La colección se encuentra conservada por subcultivos en caldo marino con glicerol al 30% a -80° C (Malik *et al.*, 1991).

Microorganismos de referencia y de origen humano:

Como diana para la detección de actividad antimicrobiana, se utilizaron los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella entérica* ATCC 35664, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus sp.* (origen humano) y *Candida albicans* ATCC 10231.

#### 3.2. Medios de cultivo:

**Agar Müeller-Hinton (AMH):** Para el crecimiento de las bacterias reveladoras de actividad antimicrobiana. Formulación, extracto de carne 2 g/L, hidrolizado de caseína 17.5 g/L, almidón 1.5 g/L, agar 17 g/L, disueltos en agua destilada, pH 7.3).

**Agar Marino (AM):** Para el crecimiento de las actinobacterias. Formulación, extracto de levadura 1 g/L, peptona de carne 5 g/L, agar 17 g/L, sulfato ferroso 0.0001 g/L, agua de mar.

**Caldo Marino (CM):** Para el crecimiento de las actinobacterias. Formulación, extracto de levadura 1 g/L, peptona de carne 5 g/L, sulfato ferroso 0.0001 g/L, agua de mar.

### **3.3. Detección de actividad antimicrobiana**

#### **3.3.1. Doble Capa**

La producción de sustancias inhibitorias se evaluó mediante el método de doble capa propuesto por Dopazo *et al.* (1988). Cada una de las 75 cepas de actinobacterias se sembraron por picadura en AM. Las placas se incubaron a 35° C durante 24 h. Una vez concluido el periodo de incubación, los cultivos fueron expuestos a vapores de cloroformo por 30 min. Simultáneamente se inocularon tubos con 10 mL de AMH (mantenidos a 50° C) con biomasa bacteriana de las cepas patógenas de referencia y se ajustaron a valores de densidad óptica entre 0.08 y 0.1 a una longitud de onda de 625 nm (aproximadamente  $1 \times 10^8$  células por mL). Los tubos se homogeneizaron suavemente y el contenido vaciado en las placas de AM previamente expuestas a los vapores de cloroformo, formándose así la doble capa de agar. Las placas fueron incubadas a 35° C durante 24 h y al término del periodo de incubación fueron revisadas, la presencia de halos de inhibición alrededor de las colonias se interpretó como un resultado positivo.

#### **3.3.2. Prueba de antagonismo, segundo tamizaje**

Se realizaron suspensiones celulares en solución salina al 0.85% de colonias de cultivo de todos los microorganismos diana con 24 h de incubación, hasta alcanzar una densidad óptica equivalente a la escala 0.5 de McFarland (McF) (aproximadamente  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por mililitro [UFC/mL]). Se colocaron 20  $\mu$ L de la suspensión bacteriana sobre la superficie de una placa Petri con AMH y se realizó una siembra homogénea con hisopo del microorganismo revelador en toda la superficie del medio de cultivo. Posteriormente las cepas de actinobacterias fueron inoculadas por picadura usando un asa bacteriológica sobre el medio de cultivo con la siembra de los microorganismos diana y las placas fueron incubadas a 35° C durante 24 h.

Finalmente se realizaron las lecturas para evaluar la presencia de un halo de inhibición alrededor de las cepas de actinomicetos.

#### **3.4. Obtención de los sobrenadantes de cultivos**

Las cepas que mostraron actividad antimicrobiana se seleccionaron para la producción de sustancias antimicrobianas en CM. A partir de una colonia obtenida de un cultivo de AM se preparó un pre-inóculo en 50 mL de caldo marino y se incubó a 37° C durante 10 h a 120 rpm. Se transfirió 25 mL del pre-inóculo a un matraz (500 mL) que contenía 225 mL de CM y se incubó a 37° C durante 7 días a 120 rpm. Posterior al periodo de incubación se tomaron 4 mL de cada cultivo y se centrifugaron a 3,000 rpm, posteriormente se recuperaron los sobrenadantes y se volvieron a centrifugar a 10,000 rpm con el fin de precipitar restos celulares.

#### **3.5. Crecimiento sobre papel celofán**

Sobre la superficie de una placa de AM se colocó una membrana de papel celofán (constituido de celulosa vegetal), paralelamente se prepararon suspensiones celulares en regulador salino de fosfato (PBS, *por sus siglas del inglés*) a partir de cultivos de 48 horas de las cepas de actinobacterias seleccionadas. Posteriormente 50 µL de esta suspensión se depositaron sobre el papel celofán y luego se procedió a una siembra masiva extendiendo el inóculo con un hisopo estéril, la placa se incubó 7 días a 35° C. Posterior al periodo de incubación se procedió a la recolección de la biomasa con una espátula y fue suspendida en PBS (NaCl 8 g/L, KCl 0.2 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44 g/L y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 g/L) en una relación de 0.2 g de biomasa/1 mL de PBS.

#### **3.6. Obtención de los filtrados de cultivo**

Las suspensiones celulares se filtraron a través de membranas (Minisart®) con poros de 0.2 µm de diámetro para eliminar las células y finalmente obtener los productos extracelulares.

#### **3.7. Ensayo de detección de actividad antimicrobiana en placa**

La actividad antibacteriana de los filtrados y de los sobrenadantes de cultivo se detectó depositando 20 µL de los mismos sobre un césped del microorganismo revelador. Las placas se incubaron a 37° C durante 24 h. La actividad

antimicrobiana se visualizó por la presencia de una zona de inhibición del crecimiento sobre el césped bacteriano de los microorganismos diana.

### **3.8. Ensayo de dilución crítica y tratamiento con proteinasa K**

Se realizó una dilución seriada en base 2, de los filtrados de cultivos de interés obtenidos mediante la técnica de crecimiento sobre papel celofán. Posteriormente se añadió 20  $\mu\text{L}$  de cada una de estas diluciones sobre un césped de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Se definió como unidad arbitraria de actividad a la máxima dilución realizada, la cual generó un halo de inhibición de crecimiento de los microorganismos diana (Mayr-Harting *et al.*, 1972). Se realizó una proteólisis de las muestras al someterlas a un tratamiento con proteinasa K con el fin de demostrar si los compuestos responsables de la actividad son de naturaleza proteica y sensibles a la hidrólisis con esta enzima (Ebbensgaard *et al.*, 2015). Con el objetivo de corroborar la eficacia de dicha enzima se probaron diferentes concentraciones de proteinasa K (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 1  $\text{mg}/\text{mL}$ ) para hidrolizar albúmina sérica bovina (BSA, *por sus siglas en inglés*) a una concentración de 0.5  $\text{mg}/\text{mL}$  y se evaluaron dos temperaturas de digestión 37° C y 55° C. La BSA fue usada como control positivo para establecer la eficacia de la proteinasa K. Finalmente se seleccionaron las condiciones experimentales de digestión enzimática de los filtrados bioactivos.

### **3.9. Detección de bacteriocinas**

#### **3.9.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)**

**Glicina-SDS-PAGE:** Las muestras disueltas en regulador (tris-glicina 0.5 M, azul de bromofenol 0.05%, glicerol al 10% y SDS 2%; pH 6.8) se calentaron a 100° C por ebullición durante 5 min y posteriormente se centrifugaron a 10,000 rpm durante 1 min. La electroforesis se realizó en condiciones desnaturizantes según Ausubel *et al.* (2002). Los geles separadores (12%) y concentradores (4%), de dimensiones 7.5 cm x 10 cm x 0.75 mm, se prepararon en el sistema Mini-Protean® II Cell, en los cuales se aplicó 1  $\mu\text{L}$  del patrón de peso molecular Thermo scientific; con pesos entre los 11-245 kDa, 40  $\mu\text{L}$  de muestra para los geles destinados a la bioautografía y 15  $\mu\text{L}$  para el resto de las muestras. Para la

corrida electroforética, el sistema se sometió a inicialmente a un voltaje de 30 V para el gel concentrador y posteriormente a un voltaje de 100 V para el gel separador hasta que el frente de corrida alcanzó el borde inferior de los geles.

**Tricina-SDS-PAGE:** Los geles se prepararon basado en la metodología descrita por Shunyan *et al.* (2016) que permite separar proteínas de un rango de masa molecular de 1 a 100 kDa. El gel separador se preparó con: 8% de acrilamida; Tris-base 1.0 M pH 8.5; SDS 0.1% y glicerol al 10%. El gel concentrador se preparó con: 4% de acrilamida; Tris-base 1.0 M pH 8.5 y SDS 0.1%. Se empleó un amortiguador catódico (Tris-base 0.1 M pH 8.5, Tricina 0.1 M y SDS 0.1%) y un amortiguador anódico (Tris-HCl 0.2 M pH 8.9). Se aplicó 1  $\mu$ L del patrón de peso molecular Thermo scientific; con pesos entre los 1.7-40 kDa, 40  $\mu$ L de muestra para los geles destinados a la bioautografía y 15  $\mu$ L para el resto de las muestras. El sistema se sometió inicialmente a un voltaje de 30 V para el gel concentrador y posteriormente a un voltaje de 100 V para el gel separador hasta que el frente de corrida alcanzó el borde inferior de los geles.

### **3.9.2. Autobiografía en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

La evaluación de la actividad antibacteriana de los péptidos presentes en el gel de poliacrilamida se realizó mediante la técnica de bioautografía. Primeramente, el gel de electroforesis SDS-PAGE sin teñir, se lavó con agua destilada durante 2 h con la finalidad de retirar el SDS y posteriormente se colocó sobre una capa de AMH usado como soporte para el gel y a la que se le denominó "capa de agarre", consecutivamente se añadió una capa de AMH (mantenidos a 50°C) con una densidad de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ajustada a 0.5 de Mc Farland. Las placas se incubaron a 35°C durante 24 h. La actividad antimicrobiana se visualizó por la presencia de una zona de inhibición de crecimiento sobre el césped bacteriano. (Yamamoto *et al.*, 2003; Lv *et al.*, 2017).

### **3.10. Separación de los compuestos mediante intercambio iónico**

Para realizar una pre-purificación de los péptidos antimicrobianos se realizó una separación mediante intercambio iónico. Los productos extracelulares se aplicaron sobre columnas de 1 mL (HiTrap™) de intercambio aniónico (Capto™ S) para

separar los péptidos con carga neta negativa y sobre una columna de intercambio catiónico (Capto™ DEAE) con la finalidad de separar los péptidos cargados positivamente. Las columnas se lavaron 3 veces con 1 mL de etanol al 20%, posteriormente las columnas fueron equilibradas haciendo pasar 3 veces 1 mL de PBS. Los péptidos antimicrobianos se eluyeron con un gradiente escalonado de concentración de cloruro de sodio 250 mM, 500 mM, 750 mM y 1 M. Se realizaron ensayos de actividad antimicrobiana en AMH a cada una de las fracciones colectadas sobre un césped de la cepa bacteriana sensible *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

### **3.11. Cromatografía en capa fina (TLC)**

El filtrado de cultivo con actividad biológica fue separado por cromatografía de capa fina en una matriz de sílica gel de 1.5 X 6 cm. La fase móvil que se utilizó estaba representada por una mezcla volumétrica de: butanol:ácido acético:agua (5:1:2) (Sugesh & Mayavu, 2013). Todos los disolventes utilizados para la preparación de la fase móvil tienen pureza analítica. El primer paso para desarrollar la TLC consistió en saturar previamente la cámara cromatográfica con los vapores de los disolventes de la fase móvil. Posteriormente se depositó 5 µL de filtrado de cultivo de la cepa 29 en un punto ubicado sobre la línea de partida, denominado punto de aplicación. Una vez aplicada toda la muestra se dejó secar la placa, luego se sometió la muestra a una migración ascendente. Se utilizaron dos placas de TLC para realizar dos cromatografías. Una vez terminada la corrida cromatográfica las placas se dejaron secar a temperatura ambiente durante media hora para evaporar la mayor cantidad de solventes. Con ayuda de un transiluminador se procedió a la visualización de las placas con luz UV. Una placa fue revelada con el reactivo de ninhidrina mientras que la otra placa designada para la bioautografía se colocó en una estufa a 50° C durante una hora para eliminar restos de solventes que pudieron quedar

#### **3.11.1. TLC-bioautografía**

La placa cromatográfica se depositó sobre una capa de AMH usado como "capa de agarre", consecutivamente se añadió una capa de AMH fundido (mantenido a 50° C) con una densidad celular de la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ajustada a 0.5 de McFarland. Las placas se incubaron a 35° C durante 24

h. La actividad antimicrobiana se visualizó por la presencia de una zona de inhibición de crecimiento sobre el césped bacteriano (Messouadi *et al.*, 2015).

### **3.11.2. TLC-semipreparativa**

Con el fin de purificar el compuesto activo se realizó una cromatografía semipreparativa. En dos placas de gel de sílice de dimensiones (6 x 20 cm). Se aplicaron 500  $\mu\text{L}$  de muestra en cada una repartidos homogéneamente en la línea de partida de la corrida cromatográfica y se procedió según la metodología descrita anteriormente. Una vez terminada la corrida cromatográfica la placa se dejó secar durante 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente con ayuda de un transiluminador se marcó con lápiz el área de la sílica donde se ubicó el compuesto antimicrobiano. La sílica marcada se recuperó y se suspendió en etanol absoluto y se filtró. El filtrado se evaporó a presión reducida y se obtuvo el compuesto antimicrobiano.

### **3.12. Caracterización estructural**

Para determinar la caracterización estructural, la muestra obtenida en el apartado anterior fue analizada por métodos espectroscópicos y cromatográficos. Se obtuvo un espectro de infrarrojo para determinar los principales grupos funcionales de la muestra y se utilizó cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas para determinar la pureza de la muestra, así como su peso molecular

El producto purificado fue analizado mediante espectroscopía de infrarrojo. El espectro de infrarrojo de las muestras fue obtenido en un espectrofotómetro de la marca Perkin Elmer, modelo Spectrum two), acoplado a un atenuador de reflectancia total (FTIR-ATR). Se realizaron, 14 barridos por muestra en el rango espectral de 500 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  a una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

Para determinar la pureza, peso molecular y posible identificación en base de datos, se realizó un análisis de HPLC-Ms, en un equipo JEOL MS-700 de alta resolución, la muestra fue ionizada por impacto electrónico (EI), los iones moleculares fueron identificados directamente del espectro de masas y las masas obtenidas fueron comparadas con la base de datos NIST. Adicionalmente se realizó una búsqueda de referencias bibliográficas para establecer la posible identidad química del compuesto activo.

### **3.13. Detección a nivel de genoma de los genes codificantes de la sintetasa de péptidos no ribosomales e Identificación molecular**

#### **3.13.1. Aislamiento del ADN**

Las 75 cepas de la colección fueron cultivadas en AM a 35° C hasta la aparición de biomasa. Al cabo del término del período de incubación se llevó a cabo la cosecha de las células, suficiente biomasa se colocó en tubos de 2.0 mL y se le adicionó 575 µL de buffer TE (Tris-EDTA pH 8.0). Posteriormente se agregaron 30 µL de dodecilsulfato sódico (SDS) al 10% y 3 µL de proteínasa K (20 mg/mL), los tubos se agitaron nuevamente en un vórtex y se incubaron durante una hora a 37° C. Finalmente se siguió el protocolo del método fenol cloroformo (Sambrook & Russell 2001; Ausubel *et al.*, 2002). El ADN se cuantificó empleando el espectrofotómetro (Nanodrop), se visualizó en geles de agarosa al 1% teñidos con GelRed y se documentó.

#### **3.13.2. Detección de la sintetasa de péptidos no ribosomales**

Las 75 cepas de la colección fueron examinadas con el objetivo de detectar a nivel de genoma la presencia de genes codificantes de la sintetasa de péptidos no ribosomales. Para lo anterior, se realizó una amplificación de PCR dirigida a amplificar regiones del dominio de adenilación de dicha enzima con este fin se emplearon dos pares de oligonucleótidos diseñados a partir de regiones conservadas de dominios de adenilación de diversas secuencias de sintetasa de péptidos bacterianas (Fischbach & Walsh, 2006). La reacción de amplificación contiene 100 ng de ADN, 5 µL de cada oligonucleótido, 5 µL de regulador de PCR 10X (0.075 mM MgCl<sub>2</sub>), 1 µL de 0.2 mM de dNTP's, 1 U de Taq polimerasa (INVITROGEN) y agua desionizada para tener un volumen final de 25 µL. El primer par de oligonucleótidos fue A2gamF/A3gamR y el programa utilizado fue: Un ciclo de desnaturalización de 94° C durante 2 min, 39 ciclos de 94° C durante 1 min, 60° C durante 1min y 72° C durante 2 min, seguidos de una fase de extensión final de 72° C por 10 min (Tambadou *et al.*, 2014). Se utilizó un segundo par de oligonucleótidos A3F/A7R y el programa utilizado fue: Un ciclo de desnaturalización de 96° C durante 3 min, 40 ciclos de 96° C durante 30 seg, 58.5° C durante 40 segundos y 68° C durante 2 minutos, seguidos de una fase de

extensión final de 72° C por 10 minutos. Los productos de PCR se evaluaron en geles de agarosa al 1%, teñidos con GelRed y fueron documentados (Gotang *et al.*, 2010).

### **3.13.3. Identificación taxonómica**

El ADN se amplificó utilizando oligonucleótidos específicos para la clase Actinobacteria, SC-Act-235aS20 y SC-Act-878aA19 para amplificar la región variable V3-V5 de la subunidad pequeña del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) 16S (Stach *et al.*, 2003) y una mezcla de oligonucleótidos, uno universal para bacterias Gram-positivas 27F y el específico de actinobacterias SC-Act-878aA19 (Farris & Olson, 2007). La reacción de amplificación contiene 100 ng de ADN, 1 µL de cada oligonucleótido, 5 µL de regulador de PCR 10X, 0.2 mM de dNTP's, 0.075 mM MgCl<sub>2</sub>, 1U de Taq polimerasa (INVITROGEN) y agua desionizada para tener un volumen final de 50 µL. Las reacciones se amplificaron en un termociclador con el siguiente programa para la mezcla de los oligonucleótidos 27F y SC-Act-878aA19: Un ciclo de desnaturalización a 95° C durante 3 min, 30 ciclos de 95° C durante un minuto, 50° C por un minuto y 72° C por 2 min, seguidos de una fase de extensión final a 72° C por 15 min (Farris & Olson, 2007). Mientras que para las reacciones con los oligonucleótidos específicos de actinobacterias SC-Act-235aS20 y SC-Act-878aA19 el programa utilizado es: Un ciclo de desnaturalización de 94° C durante 5 min, 35 ciclos de 94° C durante 40 s, 55° C durante 40 s y 72° C durante 1 min, seguidos de una fase de extensión final de 72° C por 7 min.

### **3.13.4. Secuenciación e identificación**

Los productos de PCR se enviaron a la empresa MACROGEN donde fueron purificados y secuenciados. Las secuencias obtenidas se editaron utilizando el programa FinchTV, posteriormente se realizó el análisis de alineamiento Blast entre las secuencias obtenidas y aquellas reportadas en el NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

### 3.14. Caracterización bioquímica

Las pruebas bioquímicas realizadas consistieron en la preparación de medios de cultivo para determinar la actividad metabólica de las cepas mediante la utilización de diferentes sustratos. Se prepararon medios de cultivo específicos de acuerdo con Macfaddin (2003).

Se sembraron placas de AM con las cepas que presentaron actividad y se incubaron de 48 a 72 h a 35° C, a partir de estos cultivos se prepararon suspensiones celulares y estas se utilizaron para sembrar con tres asadas los medios de cultivo con los sustratos específicos. Se utilizó un control de medio para comparar los cambios en la coloración de las reacciones positivas con el color del medio original. Los tubos se incubaron 24 a 48 h a 35° C.

Adicionalmente se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas:

**Oxidasa.** La prueba se realizó con cultivos de 48 h, sobre la placa donde se cultivó la cepa se agregaron dos gotas de reactivo para oxidasa. El cambio de coloración de café a púrpura intenso indicó una prueba positiva.

**Catalasa.** Se agregaron dos gotas de peróxido de hidrogeno sobre la cepa bacteriana cultivada en placa de agar. La producción de burbujas de gas indicó una reacción positiva.

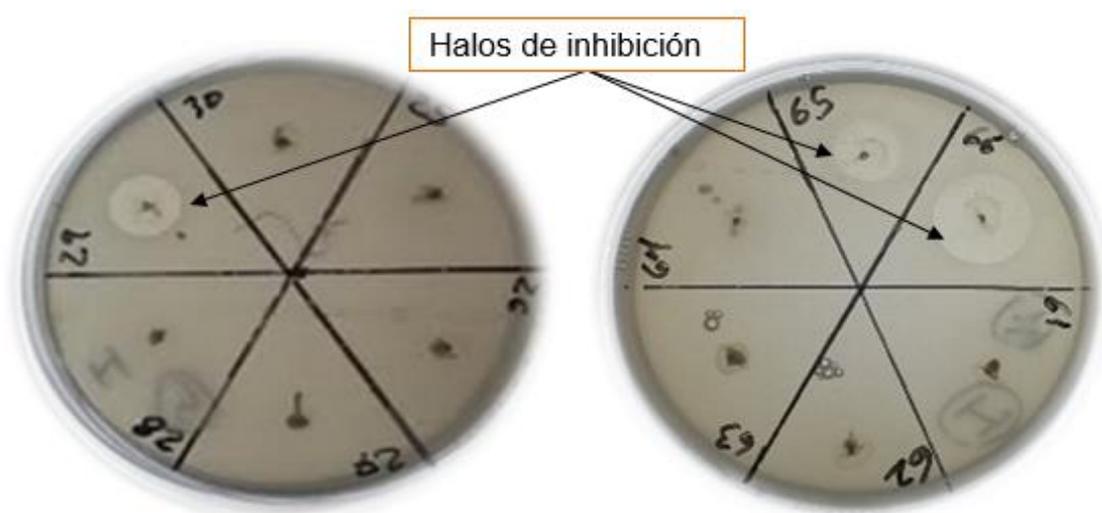
**Voges-Proskauer.** Se inocularon tubos con medio fosfato glucosa por 48 h a 35° C. A cada tubo se le agregaron una gota de  $\alpha$ -naftol al 5% y una gota de KOH al 40%. Al cabo de 10 min se realizó la interpretación, una reacción positiva de fermentación de carbohidratos es indicada por un color rojo intenso.

**Prueba de hemólisis.** Con el propósito de conocer la actividad hemolítica de la cepa 29, se tomó una colonia a partir de un cultivo de 24 h y fue resembrada en estría en placas de agar sangre (TSA con 5% de sangre de carnero). Con la finalidad de conocer el efecto hemolítico del filtrado de cultivo de la cepa 29, se colocaron 20  $\mu$ L sobre placas de agar sangre. Todas las placas fueron incubadas a 35° C y se realizaron observaciones a las 6, 12 y 24 h de cultivo. Todas las pruebas se hicieron por triplicado.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Detección de actividad antimicrobiana mediante el método de doble capa

En la primera etapa de la investigación se realizó un estudio de antibiosis mediante la metodología de doble capa descrita por Dopazo *et al.* (1988), para evaluar la respuesta antimicrobiana de 75 cepas de actinobacterias de origen marino frente a los microorganismos de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Salmonella entérica* ATCC 35664, *Escherichia coli* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Como resultado se observó que tres cepas representadas con los números 29, 65 y 66 todas pertenecientes al género *Streptomyces* sp (Tabla 4) las cuales inhibieron el crecimiento de *S.aureus* ATCC 25923 (Fig. 2) y *S.epidermidis* ATCC 14990. La actividad antimicrobiana se detectó por la presencia de un halo de inhibición del microorganismo diana alrededor de la siembra por punción de las cepas de actinobacterias productoras de compuestos antimicrobianos.



**Figura 2.** Actividad antimicrobiana detectada mediante la metodología de doble capa para tres cepas de género *Streptomyces* sp representadas con los números 29, 65 y 66 frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

### 4.2. Prueba de antagonismo, segundo tamizaje

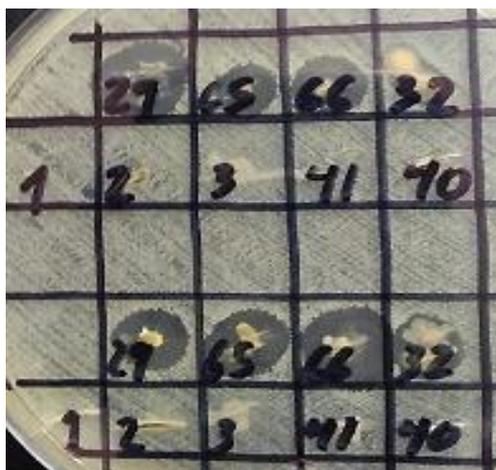
En la segunda etapa de la investigación se realizó un estudio de antagonismo para evaluar la respuesta antimicrobiana del total de 75 cepas de actinobacterias frente a los microorganismos de referencia usados en el primer tamizaje además de una cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 y una cepa de *Enterococcus* sp. de origen

humano. En el estudio de antagonismo se enfrentaron directamente los microorganismos marinos contra los agentes reveladores de actividad antimicrobiana. Para este segundo tamizaje se favorecieron las condiciones para el cultivo de los microorganismos diana debido a que ambos se enfrentaron en AMH. No obstante, se detectó actividad antimicrobiana y se observó un crecimiento vigoroso de las bacterias marinas en dicho medio. La presencia de un halo de inhibición del crecimiento de los microorganismos diana en la zona contorno de la siembra por punción de las actinobacterias reveló que además de las tres cepas (29, 65 y 66) dadas como positivas por la metodología de doble capa otras cinco cepas (25, 27, 28, 32 y 33) producen y secretan sustancias antimicrobianas incluyendo tres cepas (25, 27 y 28) que inhiben el crecimiento de *C. albicans* (Tabla 4). Una cepa (32) capaz de inhibir el crecimiento de *S. aureus* (Fig. 3) y *S. epidermidis* y finalmente una cepa identificada con el número 33 que sólo inhibe el crecimiento de *Enterococcus* sp (Tabla 4).



**Figura 3** Actividad antagonista detectada mediante la siembra por contacto directo para cuatro cepas representadas con los números 29, 65, 66 y 32 frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

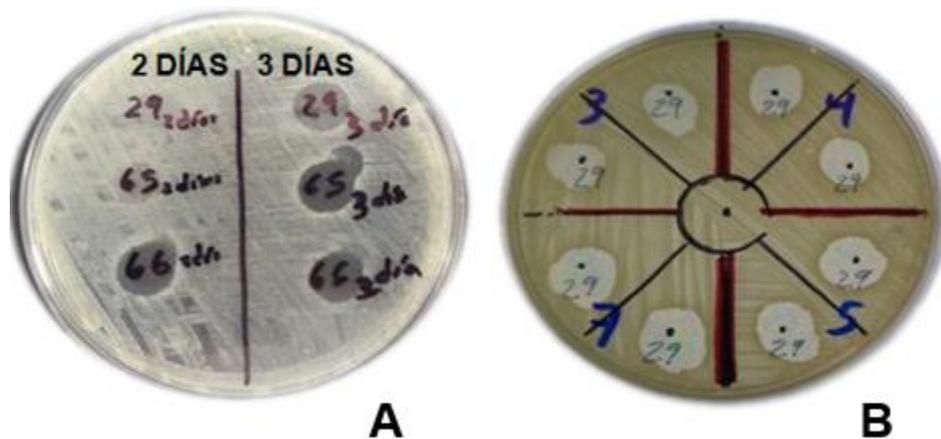
En la **figura 4** se observa el comportamiento de 9 de las 75 cepas evaluadas mediante la prueba de antagonismo y en la misma imagen es muy fácil distinguir el halo de inhibición alrededor de las cepas positivas (29, 65, 66 y 32) y que las cepas que resultan negativas (1, 2, 3, 41 y 40) indudablemente no afectan el crecimiento del microorganismo diana.



**Figura 4.** Prueba de antagonismo (duplicado) frente a *S. aureus* para 9 aislados del total de 75 cepas de actinobacterias evaluadas.

### 4.3. Ensayo de detección de actividad antimicrobiana para el sobrenadante

Se obtuvo sobrenadante de cultivo bioactivo en CM de las cepas 29, 65 y 66. Sin embargo, se comprobó que no se obtuvo sobrenadante de cultivo con actividad antimicrobiana para las cepas de actinobacterias que únicamente son positivas para la prueba de antagonismo (25, 27, 28, 32 y 33). Este resultado sugiere que estas cepas producen compuestos antimicrobianos sólo bajo la influencia del contacto directo con los microorganismos diana. Además, este resultado indica que al menos, en un inicio es posible usar el CM y otros medios de cultivos de composición química similar para estudios iniciales de fermentación. La actividad antibacteriana se detectó al visualizar una zona de inhibición de crecimiento sobre el césped bacteriano de *S. aureus* cómo se observa en la **figura 5**. Las tres cepas seleccionadas (29, 65 y 66) mediante la metodología de doble capa, producen compuestos con actividad antimicrobiana con una concentración suficiente que es posible la detección de actividad antimicrobiana al tercer día de cultivo.



**Figura 5. (A)** Actividad antimicrobiana del sobrenadante de cultivo de las cepas 29, 65 y 66 a los días de incubación 2 y 3. **(B)** Actividad inhibitoria de sobrenadante de cultivo de la cepa 29 a los 3, 4, 5 y 7 días (color azul) de incubación. Las placas se incubaron a 35° C durante 24 horas.

#### 4.4. Productos extracelulares obtenidos mediante membrana de celofán

El sobrenadante de cultivo obtenido a partir de un crecimiento microbiano en CM contiene componentes del medio de cultivo, que pueden interferir negativamente en la identificación de los compuestos bioactivos. Por tanto, teniendo en cuenta esta limitación y tomando como base el resultado anterior fue posible obtener filtrado de cultivo mediante la técnica de crecimiento sobre membrana de celofán. Esta técnica permitió obtener los productos extracelulares con una mínima cantidad de sales y compuestos orgánicos del medio de cultivo. Se verificó la actividad de los productos extracelulares obtenidos mediante crecimiento sobre membrana de celofán acudiendo a la metodología descrita en 2.7 y se observó que los filtrados de cultivos de las cepas 29, 65 y 66 mantienen la actividad antimicrobiana.

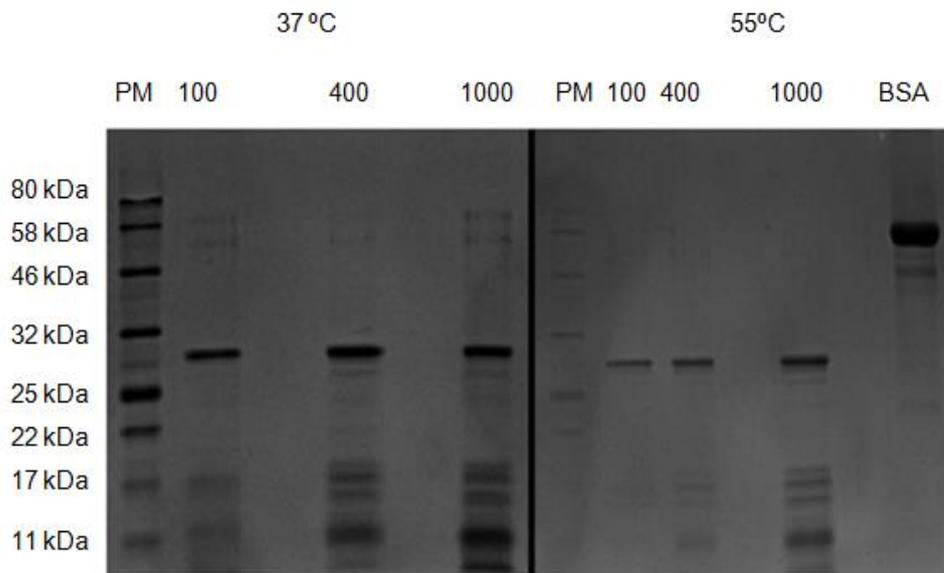
#### 4.5. Ensayo de dilución crítica y tratamiento con proteinasa K

Luego de realizar una dilución seriada en base 2 de los filtrados de cultivos de interés obtenidos mediante la técnica de crecimiento sobre membrana de celofán, se definió como unidad arbitraria de actividad (UA) a la máxima dilución realizada la cual generó un halo de inhibición de crecimiento. Según el criterio de UA se asumió que la dilución 1/64, para la cepa 29 es equivalente a la intensidad de la actividad en la fracción 1/2 de los filtrados de cultivo correspondientes a las cepas 65 y 66 (**Fig. 6**).



**Figura 6.** Ensayo de dilución crítica para las cepas representadas con los números 29, 65 y 66. (+) Presencia de actividad antimicrobiana; (-) Ausencia de actividad antimicrobiana.

Posteriormente se realizó una proteólisis de las muestras con proteinasa K, dicha enzima es una serina proteasa de 23 kDa muy utilizada en Biología Molecular por sus múltiples aplicaciones para digerir proteínas no deseadas, principalmente eliminar endotoxinas y nucleasas (Petsch, 1998). El patrón de albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) una proteína estándar de 68 kDa, muy utilizada en los experimentos electroforéticos como control, muestra la eficacia de la acción de esta enzima. Como se muestra en la **figura 7**, no se observan bandas proteicas correspondiente a la degradación del BSA en los carriles donde se aplicó dicha proteína tratada con proteinasa K, al compararse con las muestras sin digerir. Las condiciones experimentales evaluadas fueron tres valores de concentración de proteinasa K (100 µg/mL, 400 µg/mL y 1000 µg/mL) así como las temperaturas de digestión 37 y 55° C. Se observó una correcta proteólisis enzimática para todas las condiciones experimentales, por tanto, se eligió para la digestión de los péptidos presentes en los filtrados bioactivos la concentración menor de proteinasa K (100 µg/mL) y una temperatura de 37° C para no exponer innecesariamente a los compuestos activos a una temperatura elevada y alta concentración de proteasa, factores que pudieran afectar su estructura química.



**Figura 7.** Concentraciones de proteinasa K probadas (100 µg/mL, 400 µg/mL 1 mg/mL) para hidrolizar albúmina sérica bovina a una concentración de 0.5 mg/mL a dos temperaturas de digestión 37 y 55° C.

Luego de someter los productos extracelulares de las cepas 29, 65 y 66 a la digestión enzimática, sólo el filtrado de cultivo de la cepa 29 fue sensible a dicho tratamiento puesto que perdió su efecto antimicrobiano. En cambio, los productos celulares de las cepas 65 y 66 mantuvieron invariable su actividad inhibitoria (**Fig. 8**).



**Figura 8.** Actividad antimicrobiana de los filtrados de cultivo luego de ser sometidos a un tratamiento con proteinasa K. (C): Filtrado de cultivo nativo. (1 y 2): Filtrado de cultivo tratado con proteinasa K.

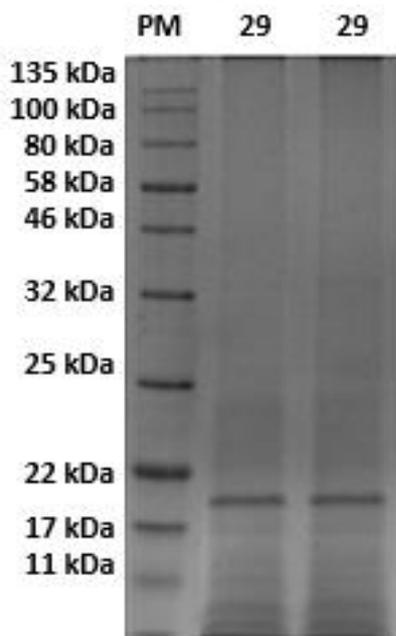
En la **figura 8** se observa únicamente la pérdida de actividad antimicrobiana para los productos extracelulares producidos por la cepa 29. En cambio, los compuestos antimicrobianos que producen las cepas 65 y 66 no se afectan por dicho tratamiento.

El criterio usado para la interpretación de esta prueba fue cualitativo y consistió en observar una pérdida del halo de inhibición de los filtrados de cultivos tratados con

proteínasa K en contraste a los filtrados de cultivos nativos. Este resultado sugiere que el compuesto antimicrobiano de la cepa 29 es de naturaleza peptídica.

#### 4.6. Detección de péptidos antimicrobianos. Autobiografía en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

##### 4.6.1. Perfiles para compuestos de alto peso molecular (Glicina-SDS-PAGE)

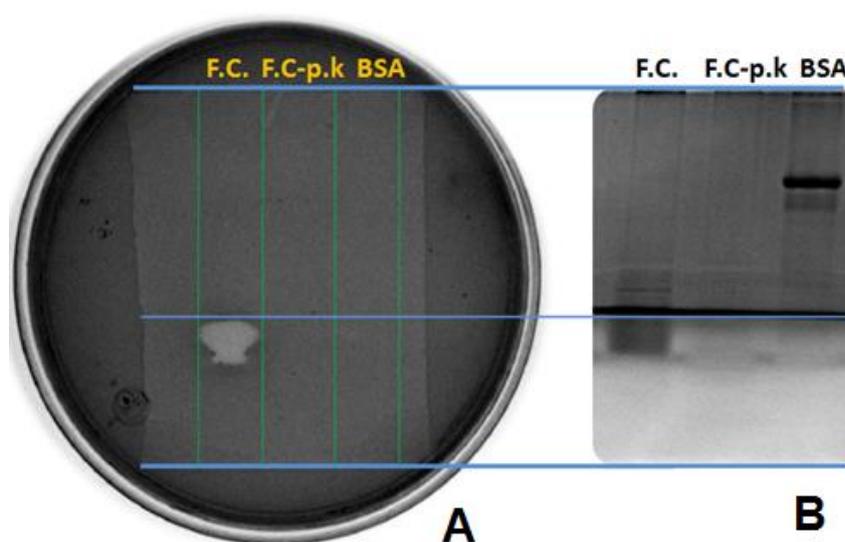


**Figura 9.** Perfil electroforético de alto peso molecular de los filtrados de cultivo obtenidos de la biomasa recuperada mediante la técnica de crecimiento sobre membrana de celofán para la muestra 29 (duplicado).

El perfil electroforético de Glicina-SDS-PAGE correspondiente a los productos extracelulares de la cepa 29 (**Fig. 9**) permitió obtener un patrón bien definido y con una adecuadantidez. En el mismo se observa notoriamente una sola proteína con un peso molecular aproximado de 23 kDa. Sin embargo, en la parte inferior del perfil cromatográfico por debajo de los 17 kDa se observa una zona más oscura que el resto del perfil, con la presencia de bandas muy tenues que pudieran indicar la existencia de proteínas de bajo peso molecular y péptidos expresados por la cepa 29. No obstante, para obtener el perfil electroforético de estos compuestos de bajo peso molecular es necesario acudir a una separación de la muestra mediante Tricina-SDS-PAGE.

En la autobiografía Glicina-SDS-PAGE realizada a partir de los compuestos extracelulares de la cepa 29 (**Fig. 10**) se observa una amplia zona de inhibición, ubicada delante del frente de corrida electroforético lo que sugiere que los

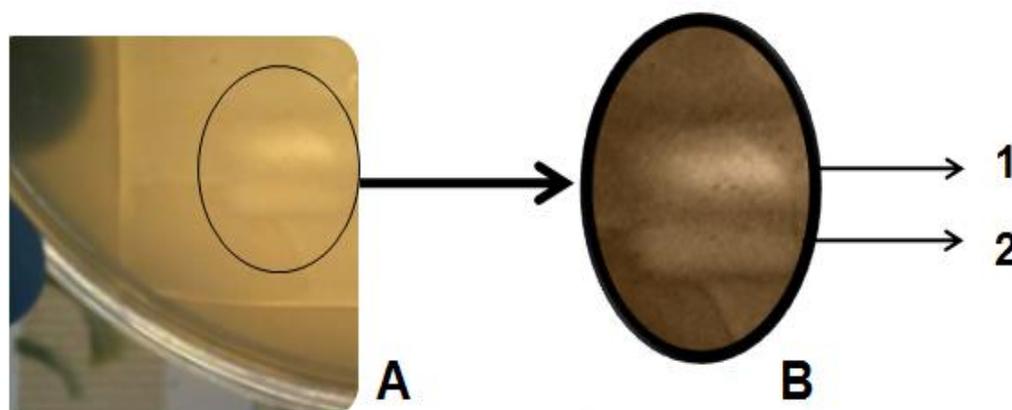
compuestos responsables de la actividad antimicrobiana son compuestos proteicos de bajo peso molecular. Se aprecia una zona de inhibición enmarcada en un área amplia que pudiera ser producto de dos o más halos de inhibición solapados, por tanto, se modifica arbitrariamente un parámetro del experimento original con el fin de poder discriminar correctamente las zonas de inhibición y por lo tanto el desplazamiento de los péptidos antimicrobianos de interés. Se aplicó un volumen menor de muestra a cada pocillo del gel de electroforesis, sólo 20  $\mu$ L con la finalidad de disminuir la concentración de los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana como modificación de la metodología inicial 2.9.3.



**Figura 10.** Autobiografía de los compuestos extracelulares de la cepa 29. En la figura se muestran dos geles de electroforesis dónde se aplicaron las muestras siguiendo el siguiente orden: **F.C.:**filtrado de cultivo, **F.C-p.k:**filtrado de cultivo tratado con proteinasa K, **BSA:** suero albúmina bovina (control negativo). Un gel sin teñir fue usado para la detección de los compuestos con actividad antimicrobiana (**A**), el segundo gel fue sometido al proceso de tinción con Azul Brillante de Coomassie CBB (**B**).

La modificación planteada anteriormente con el propósito de que disminuya la zona de inhibición, permitió obtener una adecuada definición de dos bandas de inhibición, las cuales pueden corresponder a dos péptidos antimicrobianos extracelulares producidos por la cepa 29 (**Fig. 11**). Al disminuir el volumen de muestra aplicada en el pocillo del gel, disminuyó también la concentración de los compuestos antimicrobianos separados mediante la electroforesis, se transfirió una menor cantidad de compuestos activos a la capa de AMH que contiene el microorganismo de referencia y se presentó una disminución en las zonas de inhibición esto permitió diferenciarlos apropiadamente. Al modificar el contraste de

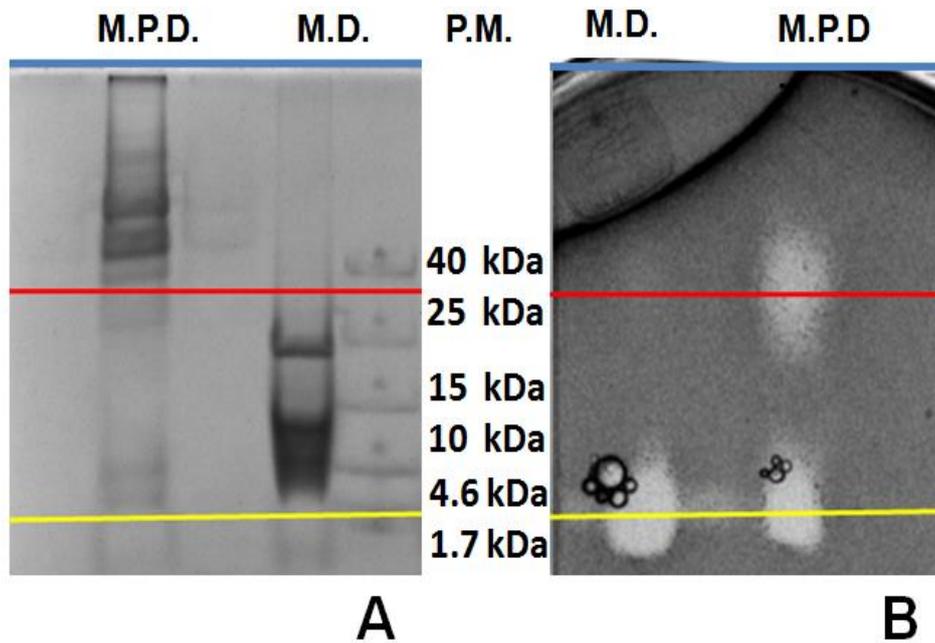
la imagen original (**Fig. 9B**) es posible observar las dos bandas con mayor resolución y nitidez (representadas con números arábigos 1 y 2) a diferencia como se muestran en la imagen original (**Fig. 9A**) donde es menos evidente la separación de los compuestos.



**Figura 11. (A)** Vista contraluz de la placa de bioautografía, en la misma se observan dos zonas de inhibición (1 y 2) del crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. **(B)** Se observa con mayor resolución al modificar el contraste de la imagen original mostrada en la figura A.

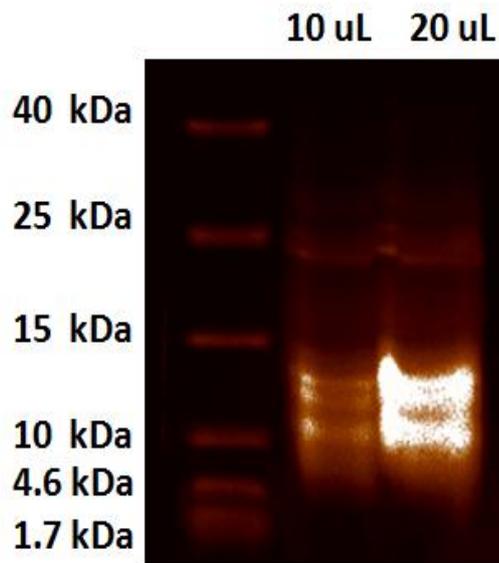
#### **4.6.2. Perfil de compuestos de bajo peso molecular (Tricina-SDS-PAGE)**

Al analizar la bioautografía realizada a partir de la electroforesis en geles de Tricina-SDS-PAGE, con el fin de evaluar la actividad de compuestos proteicos extracelulares de bajo peso molecular producido por la cepa 29, es posible apreciar una zona con actividad antimicrobiana ubicada aproximadamente a los 3.2 kDa según el patrón de bajo peso molecular (**Fig. 12, línea amarilla**). En el presente experimento una muestra no se desnaturalizó previamente al ser aplicada a los pocillos, esta particularidad favorece que las proteínas no se disocien de los agregados heterogéneos de alto peso molecular que se pueden formar, además al no calentar la muestra muchas proteínas no se desnaturalizan adecuadamente y por tanto los perfiles electroforéticos de las muestras proteicas calentadas difieren marcadamente respecto a las muestras que no sufren este proceso.



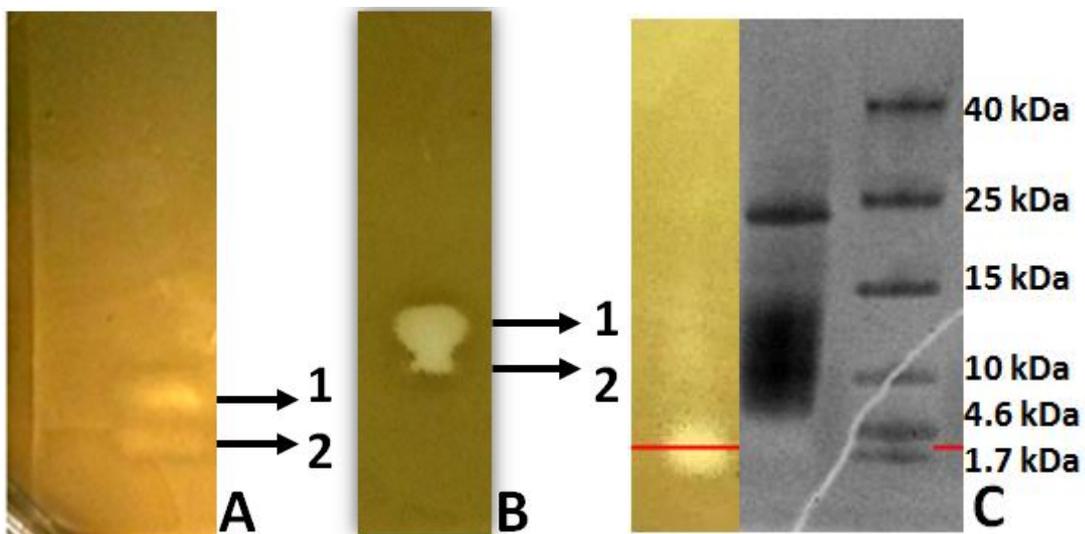
**Figura 12.** (A): Perfil electroforético Tricina-SDS-PAGE del sobrenadante de cultivo de la cepa 29, (M.P.D.) muestras parcialmente desnaturalizadas, (M.D.) muestras desnaturalizadas, (P.M) marcador de bajo peso molecular con un intervalo de 1.7 a 40 kDa. Figura 10 B, bioautografía Tricina-SDS-PAGE.

En la bioautografía se observa un patrón de inhibición de una sola banda para el carril donde fueron separadas las muestras completamente desnaturalizadas en contraste al patrón de inhibición de dos bandas observable en el carril donde fue separada la muestra parcialmente desnaturalizada (**Fig. 12, línea roja**). Este resultado sugiere que el compuesto activo en la muestra parcialmente desnaturalizada puede quedar retenido en la migración electroforética por asociarse mediante interacciones de cargas con determinadas proteínas constituyendo un complejo cuyo peso molecular es aproximadamente de 40 kDa generando una segunda zona de inhibición observable aproximadamente a los 40 kDa (**Fig. 12, línea roja**). En la **figura 13** se observa una foto que muestra una notable resolución y corresponde a la electroforesis para proteínas y péptidos extracelulares de bajo peso molecular producidos por la cepa 29. Según la interpretación anterior el péptido antimicrobiano producido por la cepa 29 tiene un peso molecular aproximado de 3.2 kDa. Sin embargo, en la **figura 11** no es posible apreciar una banda peptídica con dicho peso molecular. La banda de menor peso molecular observada en la siguiente figura corresponde a una proteína de 11 kDa.



**Figura 13.** Electroforesis en gels de Tricina-SDS-PAGE de los productos extracelulares de la cepa 29.

El sistema Tricina-SDS-PAGE ofrece una mayor resolución en la separación de compuestos de bajo peso molecular en comparación con el sistema de Glicina-SDS-PAGE, por tanto, asumimos que se trata de un sólo compuesto y su verdadero desplazamiento se muestra con el sistema Tricina-SDS-PAGE notablemente visible en la **figura 14 C**.

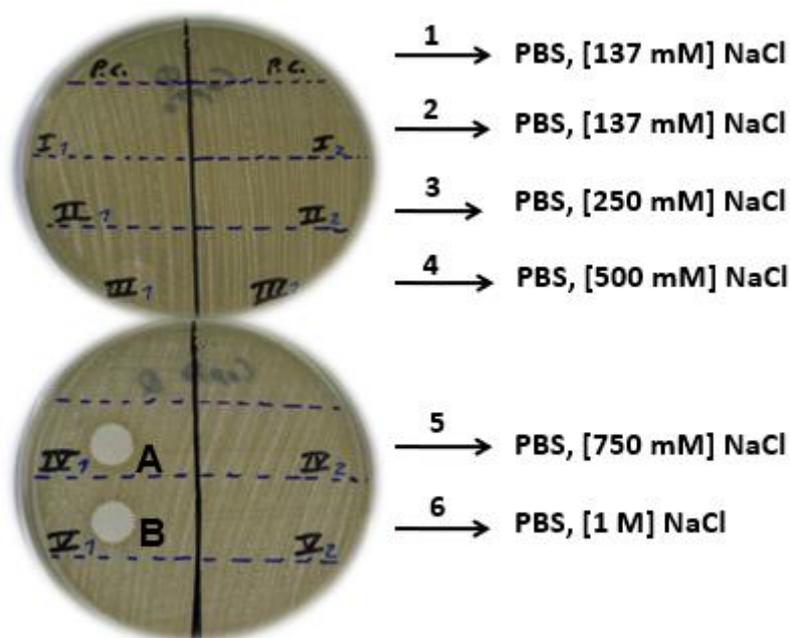


**Figura 14.** Bioautografía de los productos extracelulares de la cepa 29: (A y B) bandas de inhibición (1 y 2) obtenidas mediante el sistema Glicina-SDS-PAGE. (C) banda de inhibición (marcada con línea roja) como resultado de la bioautografía Tricina-SDS-PAGE de los productos extracelulares de la cepa 29.

Las imágenes anteriores muestran que la bioautografía de los productos extracelulares de la cepa 29 la misma que fue desarrollada a partir de los geles obtenidos mediante el sistema de Glicina-SDS-PAGE, muestran dos bandas de inhibición (1 y 2) visibles en las **figuras 14A y B**, en cambio la bioautografía Tricina-SDS-PAGE de los productos extracelulares de la cepa 29 muestra una sola banda de inhibición.

#### 4.7. Separación de los compuestos mediante intercambio iónico

La purificación inicial de los compuestos antimicrobianos se realizó mediante intercambio iónico. Se desarrolló un esquema de purificación a partir de filtrados de cultivo de la cepa productora crecida en membrana de celofán. Los productos extracelulares se cargaron en columnas de 1mL (HiTrap™) de intercambio aniónico (Capto™ S) y en una columna de intercambio catiónico (Capto™ DEAE). Posteriormente se eluyeron los compuestos con concentraciones crecientes de cloruro de sodio.



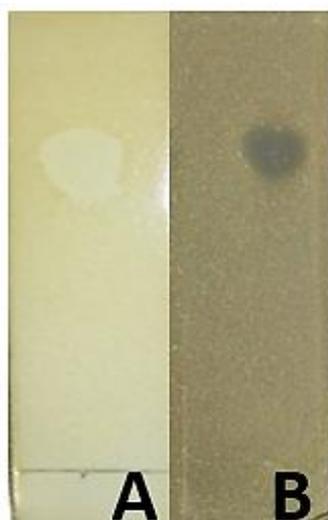
**Figura 15.** Halos de inhibición de las fracciones eluidas A y B.

Se analizaron cada una de las fracciones eluidas para determinar su capacidad de formar halos de inhibición de crecimiento sobre un césped microbiano sensible, observándose actividad en las fracciones que contienen los metabolitos de interés

representadas con los números 5 y 6 de la **figura 15**, los cuales eluyen a concentraciones de NaCl de 750 mM y 1 M respectivamente.

#### 4.8. Cromatografía en capa fina en gel de sílica y autobiografía (TLC)

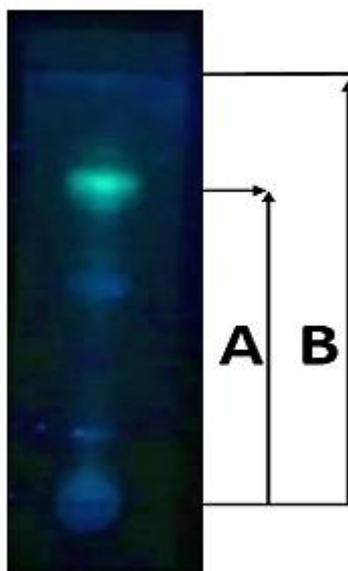
Con el objetivo de disponer de más evidencias a fin de determinar si los compuestos activos son de naturaleza peptídica, se procedió a realizar una cromatografía en placa fina en gel de sílica (TLC, *por sus siglas del inglés*), para posteriormente revelar la placa con el reactivo de ninhidrina (utilizado para revelar proteínas y aminoácidos) y paralelamente realizar una autobiografía a partir de una placa sin teñir.



**Figura 16.** Bioautografía en placa fina del compuesto antimicrobiano producido por la cepa 29. **(A)** La placa de TLC quedó embebida en la capa de agar que contiene al microorganismo revelador (*Staphylococcus aureus* ATCC). **(B)** La placa fue impregnada durante 30 min sobre la capa de agar con *S. aureus* ATCC, posteriormente fue retirada.

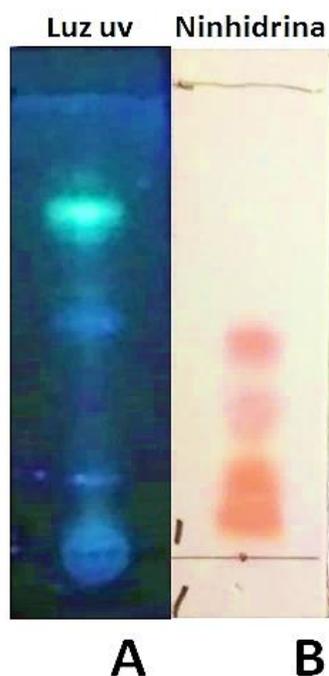
La zona de inhibición del crecimiento del microorganismo diana, presenta un factor de retención  $RF = 0.7$  que coincide con el RF del compuesto verde fluorescente observado en la **figura 16**. La constante RF mide la retención de un compuesto y se define como:  $RF = \text{Distancia de la muestra desde el punto de aplicación} / \text{Distancia del eluyente desde el punto de aplicación}$ . Es de destacar que debido a la fluorescencia UV natural del compuesto antimicrobiano es fácil determinar su desplazamiento usando un transluminador UV, obteniéndose así una razón entre las distancias de corrida A/B de 0.7. Este experimento se orientó con el fin de aportar elementos para comprobar si la fracción peptídica es la

fracción biológicamente activa, por tanto, la investigación precisó de una fase móvil que permitiera una adecuada resolución cromatográfica de los compuestos fluorescentes bajo luz UV, así como de los metabolitos de naturaleza peptídica.



**Figura 17.** Perfil cromatográfico de capa fina en una matriz de gel de sílica de 1.5 X 6 cm del filtrado de cultivo de la cepa 29. Vista bajo luz ultravioleta  $\lambda = 250$  nm. La zona fluorescente de color verde corresponde al desplazamiento cromatográfico del compuesto de interés. A: Distancia de desplazamiento entre el punto de aplicación y el compuesto de interés. B: Distancia de desplazamiento entre el punto de aplicación y el frente de corrida cromatográfico.

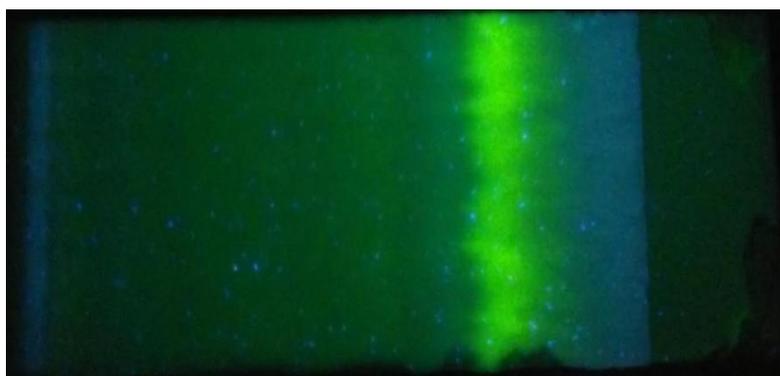
La mancha verde fluorescente se observa muy intensa y homogénea, por tanto, es fácil identificar el desplazamiento del compuesto, se establece que la fase móvil constituida por una mezcla volumétrica de: butanol: ácido acético: agua (5:1:2) puede ser utilizada a fin de purificar el compuesto bioactivo producido por la cepa 29. El compuesto con actividad antimicrobiana no se ubica en la zona del perfil cromatográfico donde se encuentran los péptidos y proteínas extracelulares correspondientes a la cepa 29 (**Fig. 18**). Por tanto, esta evidencia sugiere que el compuesto activo no es de naturaleza peptídica.



**Figura 18.** Contraste entre dos perfiles cromatograficos de la cepa 29. **(A)**: observado bajo luz ultravioleta y **(B)**: revelado con el reactivo ninhidrina.

#### 4.8.1. TLC-semipreparativa

En la **figura 19** se observa el resultado de la TLC-semipreparativa realizada con el propósito de purificar el compuesto activo. El desplazamiento del compuesto de interés se observa como una franja verde fluorescente intensa.

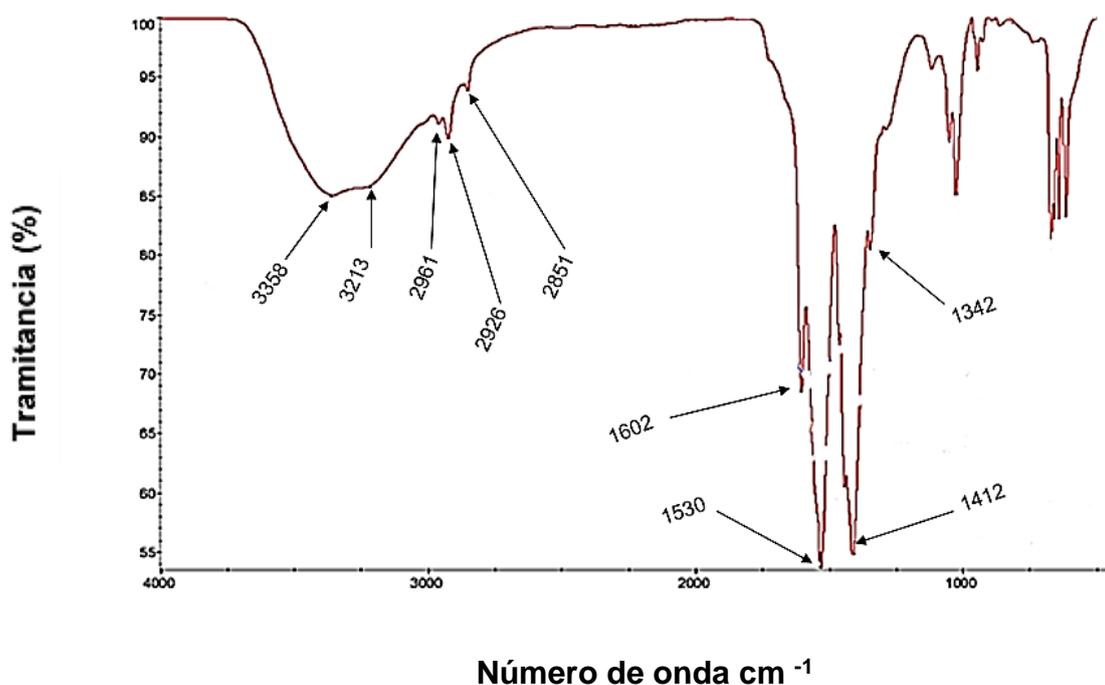


**Figura 19.** TLC-semipreparativa de los productos extracelulares de la cepa 29. Vista bajo luz ultravioleta  $\lambda = 250$  nm. La zona fluorescente de color verde corresponde al desplazamiento cromatográfico del compuesto antimicrobiano.

La porción de la sílica que contiene el compuesto antimicrobiano se resuspendió en etanol absoluto, se filtró y posteriormente el filtrado se sometió a una evaporación al vacío obteniéndose el compuesto antimicrobiano con un mínimo de impurezas. Finalmente se logró recuperar 9 mg del compuesto en estado seco el cual fue utilizado para las pruebas posteriores.

#### 4.9. Caracterización estructural

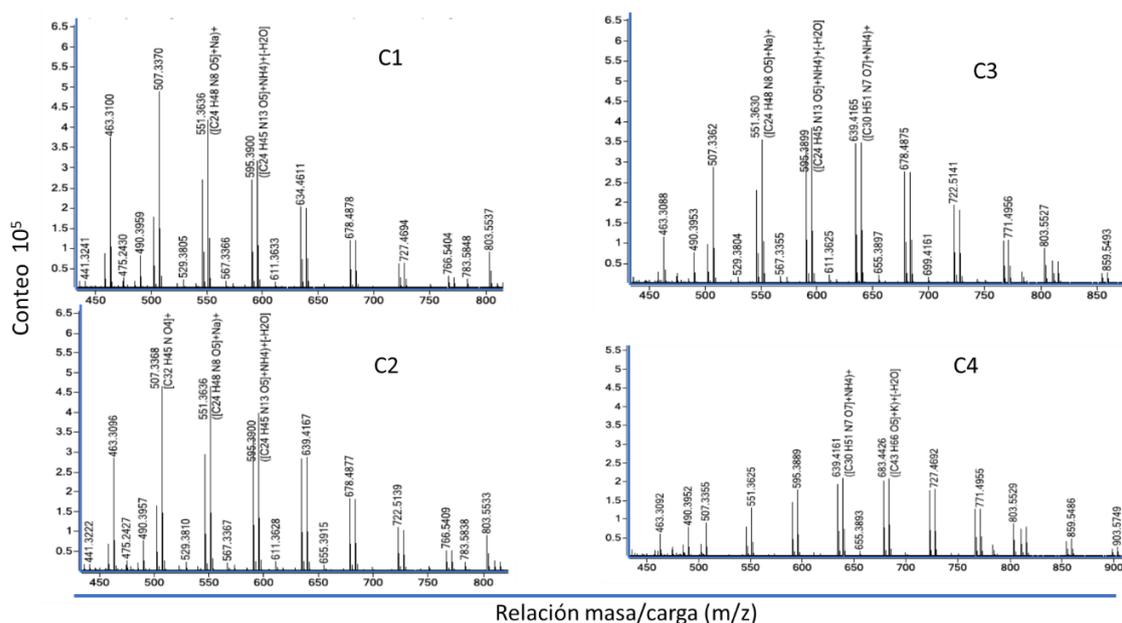
El espectro de infrarrojo mostrado en la **figura 20**, muestra bandas de absorción en el rango espectral de los 3400-3200  $\text{cm}^{-1}$ , asignadas a los estiramientos de los enlaces O-H, también muestra bandas de absorción entre los 2999-2900  $\text{cm}^{-1}$  atribuidas a los enlaces de los grupos  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$ , las bandas observadas a los 1602, 1530 y 1412  $\text{cm}^{-1}$ , son atribuidas a los vibraciones de enlaces carbono-oxígeno (C-O-C, C=O, COO) y Nitrógeno- Hidrógeno (N-H).



**Figura 20.**Espectro infrarrojo medio del compuesto antimicrobiano producido por la cepa 29.

El resultado del análisis por HPLC-Ms mostró una mezcla de 4 compuestos con tiempos de retención de 4.824, 4.873, 4.972 y 5.105 min., respectivamente. Como se puede observar los tiempos de retención son muy cercanos esto nos permite

suponer que la composición de los cuatro compuestos es muy similar, basados en su comportamiento cromatográfico. Contrariamente en los ensayos por TLC y electroforesis, solo se observan una sola mancha activa, por lo que surgió la suposición de que se trataba de un solo compuesto, ahora con la nueva evidencia sabemos que se trata de una mezcla de compuestos con características similares posiblemente una mezcla de isómeros o compuestos altamente relacionados, por lo menos los dos primeros, los cuales muestran masas moleculares de 803.55 cada uno (**Fig. 21, C1 y C2**) y tiempos de retención muy cercanos (8.824 y 8.872 min), los otros dos con tiempos de retención ligeramente separados, tienen iones moleculares de mayor tamaño (859.5493 y 903.5749 umas, respectivamente) que podrían ser derivados o aductos de otros compuestos.



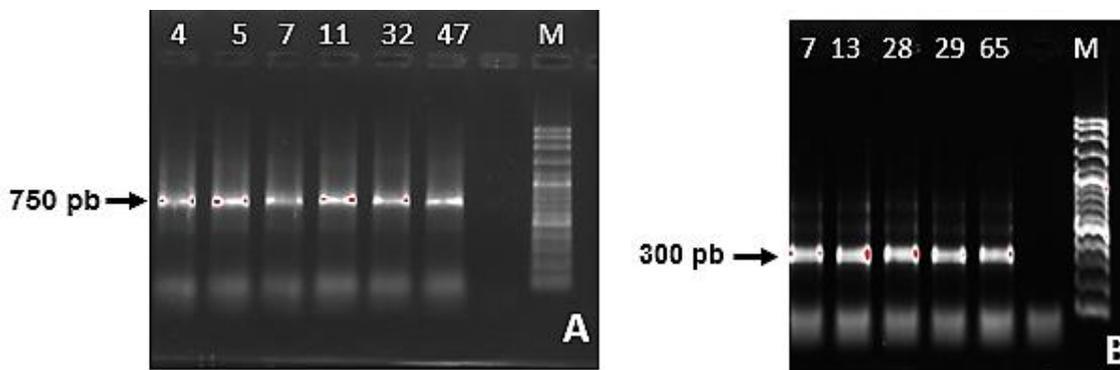
**Figura 21.** Espectro de masas C1 Tr.-4.824, C2 Tr.-4.873, C3 Tr.-4.972, Tr.-5.105 min

#### 4.10. Identificación taxonómica y de la NRPS.

##### 4.10.1. Identificación de la NRPS

Las 75 cepas de actinobacterias fueron examinadas por PCR para detectar la presencia de genes asociados al dominio de la NRPS, con el objetivo de conocer la distribución de estos genes asociados con rutas de síntesis de los péptidos no

ribosomales en la colección de actinomicetos. Del total de los aislamientos, solo en 10 cepas se obtuvieron los productos de PCR esperados (**Fig. 22**).



**Figura 22.** Amplificación de ADN de actinobacterias con oligonucleótidos para genes NRPS. **(A)** Oligonucleótido A3F/A7R, amplicón de 750 pb correspondiente a las cepas representadas con los números 4, 5, 7, 11, 32 y 47. M, marcador 3 Kb. **(B)** Oligonucleótido A2F/A3R amplicón de 300 pb correspondiente a las cepas representadas con los números cepas 7, 13, 28, 29 y 65 marcador 3 Kb.

El alineamiento de secuencias se llevó a cabo mediante la herramienta bioinformática Blast. A pesar de secuenciar 10 cepas, sólo se observó resultados de alineación de secuencia para una cepa representada con el número 11. Inicialmente el resultado del alineamiento de la secuencia NRPS de la cepa 11 mostró que para los primeros 25 resultados sólo se pudo alinear una secuencia de NRPS de la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) con código de acceso KX707809, la cual mostró un valor de 16% de identidad efectivo de la secuencia comparada y un porcentaje de similitud de 97.22% respecto a la secuencia NRPS de la cepa representada con el número 11. Debido a que el valor de 16% de secuencia comparada se considera un valor bajo (Tambadou *et al.*, 2014), además, muchos resultados arrojados por el Blast en la primera alineación no pertenecen a una secuencia de NRPS y dado que estos resultados son descartados pues el oligonucleótido empleado para la amplificación está dirigido a regiones del dominio (A) de NRPS se procedió a descargar de la base de datos la secuencia del gen NRPS del único alineamiento adecuado. Esta secuencia se usó como punto de partida para la búsqueda de similitudes con otras secuencias NRPS reportadas en el NCBI y mostradas en la **tabla 1**. En la misma se observan los porcentajes efectivos de la secuencia comparada, el porcentaje de identidad y

el código de acceso para la información disponible en el NCBI y relacionada con la única secuencia alineada en relación con 11 secuencias reportadas actualmente.

**Tabla 1.** Comparación de la secuencia NRPS de la cepa respecto a las reportadas en el NCBI.

Microorganismos	Porcentaje efectivo de la secuencia comparada	Porcentaje de Identidad	Código de acceso
<i>Streptomyces</i> sp.	30%	72.94%	KX707808.1
<i>Streptomyces</i> sp.	28%	72.57%	KX707887.1
<i>Streptomyces turgidiscabies</i>	26%	72.14%	AB698629.1
<i>Nocardia brasiliensis</i>	19%	75.98%	AB701619.1
<i>Streptomyces</i> sp.	19%	73.68%	KX707860.1
<i>Nocardia asteroides</i>	17%	75.68%	AB700133.1
<i>Streptomyces</i> sp.	10%	73.57%	KX707899.1
<i>Streptomyces</i> sp.	10%	73.52%	KX708291.1
<i>Streptomyces</i> sp.	10%	73.14%	KX708475.1
<i>Streptomyces malaysiensis</i>	6%	77.09%	AB432731.1
<i>Streptomyces</i> sp.	6%	78.01%	AB432780.1

#### 4.10.2. Identificación taxonómica

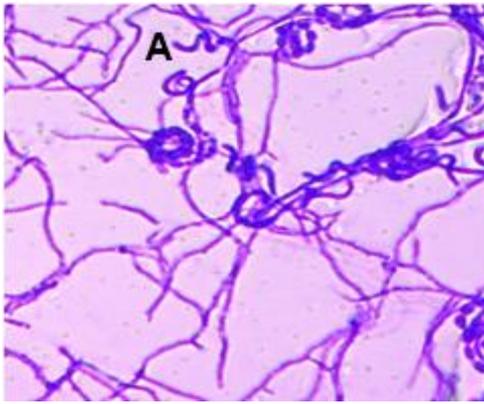
La **tabla 2** muestra la identificación taxonómica de 16 cepas seleccionadas como fuente potencial de compuestos antimicrobianos. Dentro de estas cepas se encuentran las que resultaron positivas por la metodología de doble capa, contacto directo y la presencia de NRPS en el genoma bacteriano. El porcentaje de identidad es un resultado directo de la observación de un alineamiento entre secuencias comparadas y al observar la relación de identidad de las cepas presentadas en la **tabla 2** respecto a las secuencias reportadas en NCBI vemos que las bacterias aisladas comparten un alto porcentaje de identidad con aquellas reportadas en el GenBank. La última columna de la tabla 2 muestra el código de acceso correspondiente a cada secuencia presente en esta base de datos y que comparte un alto porcentaje de identidad con la secuencia de los genes relacionados para amplificar la región variable V8 del ARNr 16S.

**Tabla 2. Identificación taxonómica de 16 cepas de actinobacterias marinas catalogadas como fuentes promisorias de compuestos antimicrobianos y seleccionadas a partir de un banco constituido por 75 cepas.**

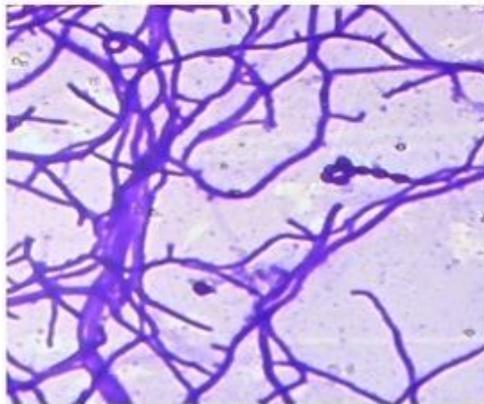
Cepas	Identificación	Porcentaje de identidad	Código de acceso
4	<i>Streptomyces atrovirens</i>	99.37%	MN428204.1
5	<i>Streptomyces</i> sp	99.68%	CP029241.1
7	<i>Saccharopolyspora cebuensis</i>	100.00%	MK878391.1
11	<i>Streptomyces</i> sp	99.84%	HQ873941.1
13	<i>Streptomyces albulus</i>	100.00%	KJ778868.1
23	<i>Streptomyces cacaoi</i>	99.68%	LC506284.1
25	<i>Streptomyces</i> sp	99.52%	KT214528.1
27	<i>Streptomyces chumphonensis</i>	100.00%	KT214528.1
28	<i>Streptomyces</i> sp	100.00%	JQ687121.1
29	<i>Streptomyces atrovirens</i>	99.84%	KX181607.1
32	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	99.77%	MK318591.1
33	<i>Streptomyces prasinosporus</i>	99.38%	MF353973.1
35	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	100.00%	MN577301.1
47	<i>Kocuria palustris</i>	100.00%	MN238749.1
65	<i>Streptomyces radiopugnans</i>	99.92%	FJ486353.1
66	<i>Streptomyces cacaoi</i>	99.67%	LR702037.1

#### 4.11. Características morfológicas y bioquímicas

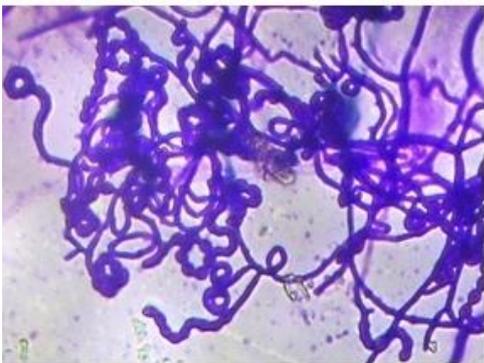
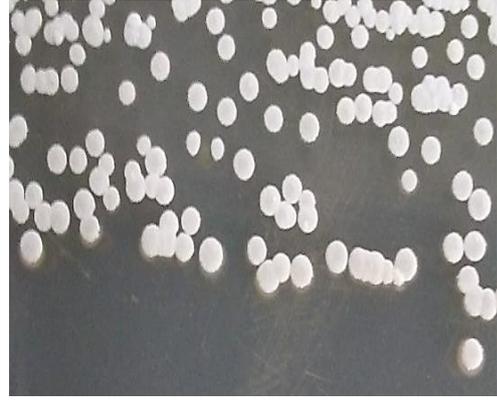
La identificación molecular de las cepas aisladas representadas con los números 29, 65 y 66, únicos para los que fue posible obtener filtrado de cultivo activo. Se complementó con una identificación morfológica con el fin de tener más elementos para caracterizar la taxonomía de estas cepas, siempre distinguiendo la cepa 29 sobre las demás debido a que es la única que posiblemente produce un compuesto antimicrobiano de naturaleza peptídica. Estas cepas producen filamentos vegetativos (o micelios vegetativos) largos aproximadamente de 1.0  $\mu\text{m}$  de diámetro y una longitud indefinida, muy ramificados y que no se fragmentan. Los filamentos aéreos para las tres cepas mencionadas anteriormente presentan formas como espirales, enroscamientos y ramificaciones múltiples, con producción de esporas (conidios) en cadenas espiraladas (**Fig. 23A**). La superficie de la espora se observa de forma lisa y está asociada a la formación de pigmentos blancos (**Fig. 23**). Estas características morfológicas presentes en las cepas 29, 65 y 66 son distintivas del género *Streptomyces* sp.



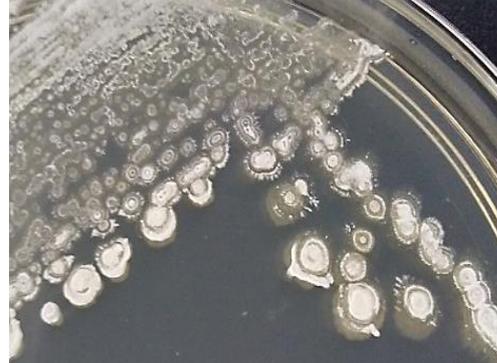
Cepa 29



Cepa 65



Cepa 66



**Figura 23.** Características morfológicas de las cepas representadas con los números 29, 65 y 66. Esporas en forma de espiral (A).

Además de la confirmación del género mediante el análisis de las características morfológicas se efectuaron pruebas de utilización de sustratos para la caracterización bioquímica de las cepas 29, 65 y 66 (**Tabla 3**). Los resultados de asimilación de sustratos constituyen una referencia para futuras comparaciones con otras cepas bioactivas reportadas de actinobacterias marinas. La cepa 29 fue sometida a una prueba de hemólisis en agar sangre con la finalidad de aportar

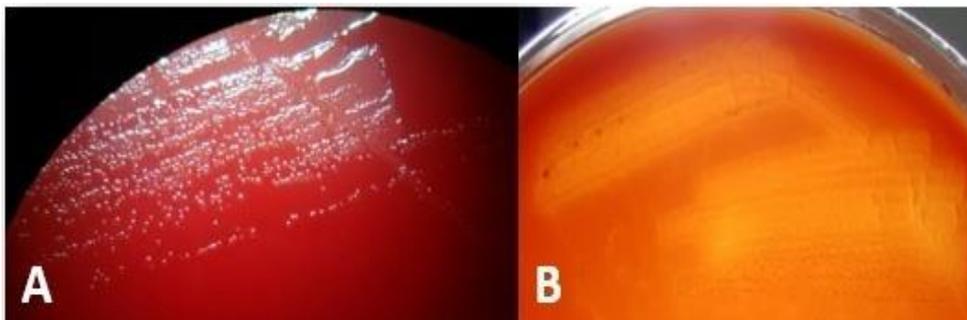
elementos que favorezcan la caracterización bioquímica de esta cepa, para aportar evidencias sobre el posible uso de este microorganismo como biomodelo para producir el compuesto antimicrobiano en estudios de fermentación química a mediana y gran escala.

**Tabla 3.** Pruebas bioquímicas efectuadas para las cepas 29, 65 y 66

Sustratos	Reacción/Enzima	Cepas		
		66	29	65
Ortonitrofenol- $\beta$ -galactósido	$\beta$ -galactosidasa	+	+	+
Arginina	Arginina dehidrolasa	-	-	-
Lisina	Lisina descarboxilasa	+	+	+
Ornitina	Ornitina descarboxilasa	+	+	+
Citrato de sodio	Utilización de citrato	+	+	+
Tiosulfato de sodio	Producción de H <sub>2</sub> S	-	-	-
Urea	Ureasa	+	-	-
Triptófano	Triptófano desaminasa	+	-	-
Piruvato de sodio	Producción de acetoina	+	+	+
Gelatina de Kohn	Gelatinasa	+	+	+
Almidón	Amilasa	-	+	-
Tween 20	Lipasa	+	+	+
Leche descremada	Proteasa	-	+	-
Queratina	Queratinasa	+/-	+	+
Quitina	Quitinasa	ND	+	+
Fosfato tricálcico	Solubilización de fósforo	+	+	-
Peróxido de hidrógeno	Producción de catalasa	+	+	+
Oxalato de p-aminodimetil alanina	Producción de oxidasa	+	+	+

Al observar la **figura 24B** es posible apreciar hemólisis alfa, que consiste en una lisis parcial de eritrocitos que produce una coloración verde-amarilla que se

observa alrededor de las colonias. Por tanto, la cepa 29 se documentó como alfa hemolítica. Sin embargo, las pruebas de hemólisis para el filtrado de cultivo de esta cepa resultaron negativas. Por consiguiente, se corroboró que el compuesto antimicrobiano producido por la cepa 29 carece de actividad hemolítica.



**Figura 24.** Perfil hemolítico de la cepa 29 crecida en agar sangre: (A) Vista bajo la incidencia directa de luz sobre las colonias celulares; (B) Vista a contraluz de las mismas colonias.

#### 4.12. Compilación de resultados

En la **tabla 4** la primera columna muestra los números que representan a las cepas de actinobacterias marinas seleccionadas en base a si resultaron positivas para algunas de las pruebas a las que fueron sometidas: contacto directo, doble capa, detección de NRPS y detección de bacteriocinas mediante bioautografía SDS- PAGE en las columnas 2, 3, 4 y 5 respectivamente. En las columnas que aparecen tituladas contacto directo y doble capa se muestran los microorganismos diana que resultaron sensibles por uno y/o ambos métodos y con un signo (–) cuando la cepa de actinobacteria no produce sustancias antimicrobianas detectables por uno y/o ambos métodos. Las cepas de actinobacterias que presentan la NRPS y/o son positivas según la metodología de autobiografía aparecen representadas (+) y las cepas que carecen de NRPS y/o resultan negativas según la bioautografía son representadas con (-).

**Tabla 4. Potencial antimicrobiano de 12 cepas de actinobacterias marinas catalogadas como fuentes promisorias de compuestos antimicrobianos y seleccionadas a partir de un banco constituido por 75 cepas. Las cepas están representadas con números arábigos y las cepas reveladoras de actividad antimicrobiana con letras mayúsculas. C: *Candida* sp., Sa: *Staphylococcus aureus*, Se: *Staphylococcus epidermidis*, E: *Enterococcus* sp. (+): Presencia; (-): Ausencia.**

<b>Cepas</b>	<b>Contacto Directo</b>	<b>Doble Capa</b>	<b>NRPS</b>
4	-	-	+
5	-	-	+
7	-	-	+
11	-	-	+
13	-	-	+
23	-	-	+
25	C	-	-
27	C	-	-
28	C	-	+
29	Sa, Se, E	Sa, Se, E	-
32	Sa, Se	-	-
33	E	-	-
35	-	-	+
47	-	-	+
65	Sa, Se, E	Sa, Se, E	-
66	Sa, Se, E	Sa, Se, E	-

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Detección de actividad antimicrobiana mediante el método de doble capa

Una de las ventajas de la metodología de doble capa es que favorece las condiciones para el cultivo de las actinobacterias así como de los microorganismos de referencia usados como reveladores de la actividad antimicrobiana. Se observó un crecimiento microbiano vigoroso con una buena obtención de biomasa, condición deseable para que un microorganismo genere un bioproducto, respecto a los microorganismos diana, se observó un adecuado crecimiento en AMH como era esperado. En este estudio de antibiosis no se enfrentaron directamente los microorganismos involucrados por lo que no se pretendió evaluar el antagonismo entre los grupos microbianos explorados. Es decir, se evaluaron las cepas de actinobacterias que producen los compuestos antimicrobianos extracelulares (constitutiva), aunque las mismas no estén en contacto directo con los microorganismos de referencia. Los resultados muestran que las cepas representadas con los números 29, 65 y 66 fueron las únicas con actividad inhibitoria frente a *S. aureus* y *S. epidermidis*. Esta característica es de resaltar para una adecuada interpretación de los resultados obtenidos en el presente estudio y documentar que, bajo las condiciones de cultivo empleadas, estas cepas producen compuestos antimicrobianos activos contra *S. aureus* y *S. epidermidis* en ausencia de una interacción directa con estos microorganismos. Es necesario resaltar este fenómeno principalmente al considerar que algunos investigadores plantean desde hace décadas que existen compuestos antimicrobianos que sólo son producidos cuando determinados microorganismos están en contacto directo (inducción), afirmando que en algunas ocasiones el antagonismo se trata de una conducta inducida para eliminar competidores en un mismo ecosistema (Williams & Vickers, 1986; Roth *et al.*, 2008) e inclusive otras veces no se comporta como un fenómeno inducido pero si es potenciado por una interacción directa (Dijksterhuis *et al.*, 1999).

### 5.2. Prueba de antagonismo, segundo tamizaje

En el estudio de antagonismo se enfrentaron directamente las cepas de actinobacterias marinas contra los microorganismos de referencia y de origen humano. Se favorecieron las condiciones para el cultivo de los microorganismos

diana. No obstante, se detectó actividad antimicrobiana y se observó un crecimiento microbiano abundante de las bacterias marinas en AMH. El resultado de dicho estudio es posible apreciarlo en la **tabla 4**. Es de gran interés el hallazgo de tres cepas (25, 27 y 28), que son capaces de inhibir el crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10231, en este sentido se puede plantear que microorganismos eucariontes parásitos de humanos, como *C. albicans* están adaptados a parasitar y pobremente dotados para resistir las dificultades de una interacción con otros microorganismos fuera del cuerpo del hospedero (Matsubara *et al.*, 2016). No obstante, la mayor parte de la bibliografía examinada sobre detección de actividad antimicrobiana de origen marino está relacionada con el hallazgo de bacterias productoras de sustancias antibacterianas y pocos autores refieren la detección de sustancias antifúngicas (Pérez *et al.*, 2001; Messaoudi *et al.*, 2015). Al mismo tiempo se observó que la cepa representada con el número 32 muestra actividad antagónica contra *S. aureus* (**Fig. 3**) y *S. epidermidis*. La cepa número 33 sólo inhibió el crecimiento de *Enterococcus* sp., este efecto sugiere que los compuestos antimicrobianos producidos por estas cepas de actinobacterias marinas tienen actividad antimicrobiana únicamente contra algunos géneros bacterianos específicos porque no fueron capaces de inhibir los otros géneros evaluados, los cuales representan bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Una ventaja de esta prueba es que los resultados se obtuvieron a las 24 h un tiempo más breve que el requerido mediante la metodología de doble capa que como mínimo demora 96 h. El significado práctico de este bioensayo de actividad radicó en poder demostrar si lo observado es el resultado de la interacción directa entre estos microorganismos o por la liberación de compuestos al medio externo en ausencia de éstos. En este estudio, tal hipótesis admite destacar el efecto letal de metabolitos antifúngicos y antibacterianos frente a microorganismos de referencia y de origen humano. Estas sustancias podrían purificarse a partir del filtrado de cultivo con la finalidad de estudiar su composición química y sus propiedades biológicas. Los estudios efectuados en este campo establecen de una manera incuestionable la existencia de interacciones bioquímicas interespecíficas que se traducen en una relación de antagonismo entre actinobacterias marinas y microorganismos terrestres (Fenical & Jensen, 2006; Kwon *et al.*, 2006; Subramani & Aalbersberg, 2012). No obstante, Carlucci & Pramer (1961) no documentaron actividad antagonista a pesar de enfrentar 200

aislados bacterianos de origen marino incluyendo diversas cepas de actinobacterias contra *E. coli* y *Bacillus* spp. de origen terrestre. El antagonismo se favorece "*in vitro*" si se utilizan medios de cultivo ricos, pero su ocurrencia y actividad en condiciones naturales, usualmente en ambientes oligotróficos, se estudia poco (Fenical & Jensen, 1996). En el presente experimento las actinobacterias marinas fueron crecidas en AMH porque es el medio de cultivo apropiado para el crecimiento de los patógenos, este medio de cultivo no es el más indicado para el crecimiento de microorganismos marinos porque no cumple los requerimientos de nutrientes y condiciones de cultivo de los mismos, en este sentido, es de resaltar que Fenical & Jensen (1996), refieren que producto del proceso evolutivo, los microorganismos marinos poseen sistemas metabólicos adaptados a condiciones de bajas temperaturas, elevadas concentraciones de sales, pH alcalinos y condiciones anóxicas y que las bacterias marinas expuestas a condiciones moderadamente extremas, pueden producir una serie de metabolitos como: enzimas, compuestos antitumorales y sustancias antimicrobianas que no son sintetizadas en condiciones óptimas de cultivo. No obstante, asumimos y documentamos para el estudio de antagonismo representado por la segunda selección, que la actividad antagónica detectada para las cepas representadas con los números 25, 27, 28, 32 y 33 es producto de la interacción directa entre los microorganismos involucrados y no debida a condiciones de cultivo como una baja salinidad. Aproximaciones como esta pueden renovar los estudios de bioprospección y contribuir al descubrimiento de nuevos microorganismos además de reavivar la pesquisa de antimicrobianos naturales.

### **5.3. Ensayo de dilución crítica y tratamiento con proteinasa K**

Partiendo del supuesto de unidad arbitraria de actividad (UA) planteado por Mayr-Harting *et al* (1972), se seleccionaron diluciones de los filtrados de cultivo bioactivos de las cepas 29, 65 y 66 en las cuales se espera que la concentración de los compuestos responsables de la actividad sea muy similar. Posteriormente estas diluciones fueron sometidas a una digestión enzimática con proteinasa K, como primer punto de control para la detección de péptidos antimicrobianos. Únicamente el filtrado de cultivo de la cepa 29 fue sensible a dicho tratamiento ya que perdió su efecto antimicrobiano (**Fig. 8**). Este resultado evidencia que la cepa

29 produce compuestos de naturaleza proteica con actividad antimicrobiana. En este sentido autores como Ebbensgaard *et al.* (2015) investigaron 8 péptidos antimicrobianos activos contra patógenos zoonóticos y de peces, compuestos de L-aminoácidos (proteínogénicos), carentes de modificaciones postraduccionales y con menos de 40 aminoácidos. Estos autores documentaron que todos los péptidos antimicrobianos resultaron digeridos con proteinasa K y que la mayoría resultaron altamente sensibles a dicho tratamiento. Además, establecieron que una incubación de los péptidos antimicrobianos con proteinasa K (100 µg/mL) a 37° C y más de 15 min, garantizó una pérdida completa de actividad. Esta investigación indica que la proteinasa K es muy efectiva contra péptidos antimicrobianos con las características estructurales descritas anteriormente. Los productos extracelulares de las cepas 65 y 66 mantuvieron invariable su actividad inhibitoria luego de ser sometidos a la digestión enzimática, este hecho indica que los compuestos antimicrobianos producidos por estas cepas no son de naturaleza proteica o que son de naturaleza proteica pero resistente al tratamiento con proteinasa K. En este sentido, algunos péptidos antimicrobianos presentan modificaciones postraduccionales que pueden dificultar la digestión con proteasas, aunque generalmente es posible observar una pérdida, al menos, parcial de la actividad antimicrobiana (Ebbensgaard *et al.*, 2015). Además, Ong *et al.* (2014) demostraron que determinados péptidos que contienen en abundancia D-aminoácidos resultan parcialmente resistentes y pocas veces totalmente resistentes a un tratamiento con proteinasa K. Por estos motivos muchas investigaciones de bioprospección orientadas hacia la búsqueda de péptidos antimicrobianos acuden a una digestión de la muestra con proteinasa K a fin de observar una pérdida de actividad antimicrobiana de la misma y por tanto parten de la premisa de que los compuestos antimicrobianos son de naturaleza peptídica (Deraz *et al.*, 2005; Banerjee *et al.*, 2011). En concordancia si los compuestos antimicrobianos expresados por las cepas 65 y 66 presentan abundantes modificaciones estructurales como las citadas anteriormente puede que sea difícil observar una proteólisis total de los mismos. Sin embargo, tampoco se visualizó una pérdida parcial de actividad, por tanto, esta evidencia apunta a que es posible que las cepas 65 y 66 no produzcan péptidos antimicrobianos resistentes a esta proteasa de amplio espectro.

## **5.4. Detección de péptidos antimicrobianos**

### **5.4.1. Autobiografía en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

La autobiografía pertenece a los métodos de bioprospección microbiológicos y representa una forma simple, reproducible y altamente sensible para la detección de compuestos biológicamente activos (Choma & Grzelak, 2010). En el presente estudio esta técnica se utilizó con la finalidad de detectar los péptidos antimicrobianos extracelulares producidos por la cepa 29. El filtrado de cultivo de la cepa 29 resultó positivo al ser evaluado mediante esta técnica. Por otro lado, si tenemos en cuenta que los compuestos antimicrobianos presentes en este filtrado son sensibles al ser sometidos a una proteólisis con proteinasa K, puede considerarse que la cepa 29 produce compuestos de naturaleza peptídica con actividad antimicrobiana. Al observar el desplazamiento de los compuestos antimicrobianos en la bioautografía Glicina-SDS-PAGE se asume que cada banda de inhibición corresponde a un péptido bioactivo diferente (**Fig. 11**). Inmediatamente surgió la necesidad de contrastar este resultado con las evidencias mostradas en las **figuras 12 y 14**, por tanto se plantea que posiblemente la cepa 29 produzca un solo compuesto antimicrobiano que se une mediante diferencia de cargas iónica a una proteína y por lo tanto donde quede desplazada esta proteína quedará una zona de actividad antimicrobiana, además de la banda de inhibición producida por el compuesto en su estado libre, también tiene cabida otra posibilidad, fundamentada en que se obstruya la migración del compuesto por una barrera física constituida por proteínas y el propio compuesto que obstruyan los poros en el gel de poliacrilamida impidiendo el paso de una porción del metabolito activo hacia su verdadero punto de desplazamiento.

### **5.5. Purificación de los compuestos mediante intercambio iónico**

El uso de columnas de intercambio iónico con la finalidad de separar el posible péptido antimicrobiano permitió la obtención de dos fracciones. En un inicio especulamos que cada una de las fracciones representa el mismo péptido antimicrobiano descrito con anterioridad. Este compuesto presenta carga neta negativa ya que es posible separarlo utilizando interacciones de carga mediante intercambio aniónico (**figura 13 A y B**). Es de tener en cuenta que en estas fracciones el compuesto puede estar en su estado libre o asociado a proteínas y

que dicha relación es considerada circunstancial, inclusive cabe la posibilidad de que sólo se haya podido separar una fracción de la cantidad total y que no se considere la concentración más adecuada de cloruro de sodio en el gradiente empleado para que eluya el resto del compuesto. Por tanto, esta relación es considerada tentativamente y es necesario sumar evidencias, que apoyen esta hipótesis, como realizar purificaciones con un gradiente más estrecho de cloruro de sodio. Además, la cromatografía de intercambio iónico es un sistema recomendado como inicial en un protocolo de purificación, lográndose complementar las etapas finales de purificación con la cromatografía de interacción hidrofóbica como la cromatografía de fase reversa y la cromatografía líquida de alta resolución (Dündar *et al.*, 2014). Esto permite una gran flexibilidad de diseños experimentales y de condiciones de elución, lo que confiere a estas técnicas una gran versatilidad. El empleo de la cromatografía de intercambio iónico para realizar una purificación del compuesto presente en el sobrenadante de la cepa 29 resultó conveniente debido a las características que posee esta técnica como alta resolución, reproducibilidad, versatilidad y biofuncionalidad, es decir, que permite mantener su actividad biológica (Staby *et al.*, 2007). Es importante señalar como limitante que la muestra obtenida mediante cromatografía de intercambio iónico puede quedar más diluida a diferencia de las muestras recuperadas con otros sistemas cromatográficos, incluso como la muestra queda suspendida en una solución acuosa se dificulta concentrarla por evaporación al vacío. No obstante, las muestras fueron concentradas por centrifugación usando el sistema Amicon®Ultra-0.5. El resultado más destacable hasta el presente apartado es la identificación de una posible bacteriocina con un peso molecular que se encuentra entre 1.7 kDa y 4.6 kDa y que se asocia mediante interacciones de carga cuando menos a una proteína. Es de tener en cuenta que en forma parcialmente desnaturalizada y en ausencia de calor el compuesto queda retenido aproximadamente a los 40 kDa, (**Fig. 12**). Posiblemente en el filtrado de cultivo en su estado nativo se generen agregados moleculares que se organicen en un complejo cuyo peso llega a superar los 40 kDa. Otro aspecto para destacar es la notoria separación del compuesto antimicrobiano mediante una purificación inicial basada en intercambio iónico, aunque es importante aplicar en el futuro otras propuestas de protocolos para purificar bacteriocinas como la metodología descrita por (Deraz *et al.*, 2005).

¿Cabe preguntarnos si es posible realizar una bioautografía SDS-PAGE a partir de las fracciones A y B a fin de ratificar si se trata del mismo compuesto bioactivo en su estado libre o asociado a proteínas?

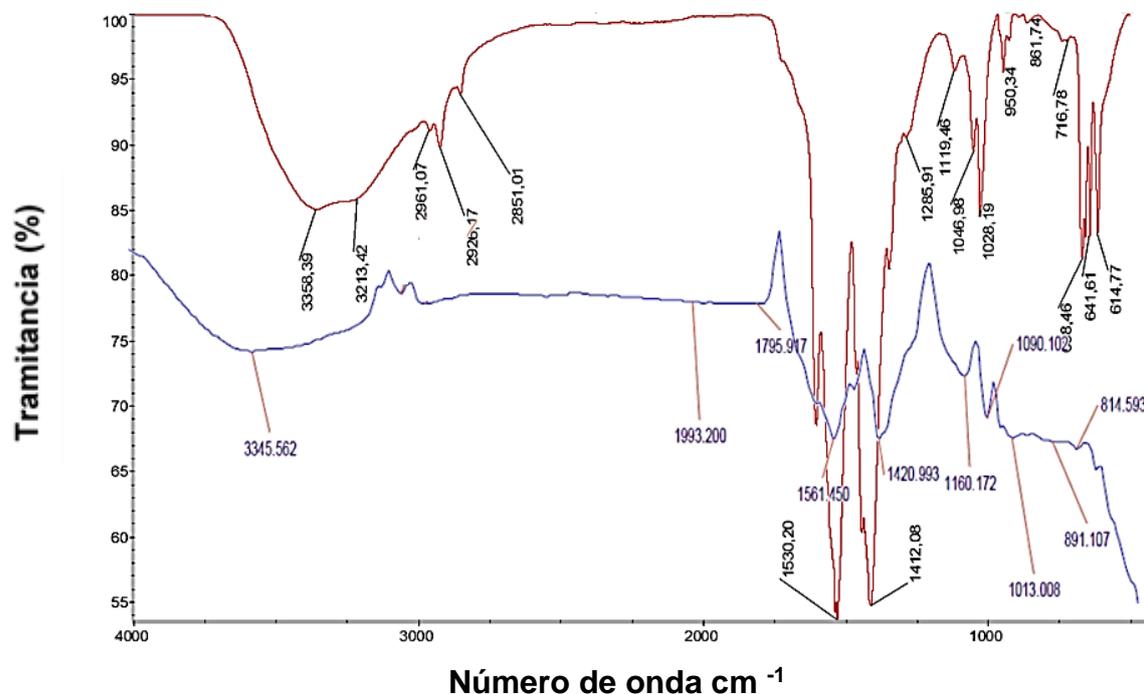
Las fracciones obtenidas después de la separación por intercambio iónico fueron concentradas por centrifugación usando filtros Amicon®Ultra-0.5 (poros de 10 kDa), con la finalidad de aumentar su efecto antimicrobiano. Es preciso aclarar que el uso de filtros Amicon®Ultra-0.5 fue posible debido a que previamente se comprobó que la actividad incrementaba al ser concentrada por este sistema y a pesar de que inferimos que el compuesto con actividad antimicrobiana tiene un peso inferior a 4.6 kDa es de tener presente que las bacteriocinas, en forma nativa, tienden a formar agregados proteicos de alto peso molecular inclusive superior a los 100 kDa además de asociarse a proteínas (Muriana & Klaenhammer, 1991) por tanto, es posible concentrar muestras naturales usando este sistema. En consecuencia, se debe conocer que las aglomeraciones de bacteriocinas se disocian por tratamientos con agentes desnaturalizantes (Jamaluddin *et al.*, 2017). Así después de concentrar la muestra por centrifugación fue posible detectar la actividad antimicrobiana de las fracciones comprobando su capacidad para formar halos de inhibición de crecimiento del microorganismo sensible, sin embargo, no se detectó mediante bioautografía Tricina-SDS-PAGE, lo que nos lleva a pensar que es necesario concentrar aún más la muestra para que pueda ser evaluada con dicha técnica. Pudiendo plantear futuros esquemas de purificación inicial que tributen a la obtención del compuesto en forma deshidratado y que preserven la biofuncionalidad del mismo.

#### **5.6. Cromatografía en capa fina en placa de gel de sílica y autobiografía (TLC)**

La bioautografía directa destaca como uno de los primeros métodos bioautográficos originalmente descritos y más ampliamente aplicados (Botz *et al.*, 2001). Al contrastar el resultado de la TLC-bioautografía y de la coloración con ninhidrina se observó que el compuesto con actividad antimicrobiana no se ubica en la zona del perfil cromatográfico donde se encuentran los péptidos y proteínas extracelulares correspondientes a la cepa 29. Por tanto, esta evidencia sugiere que el compuesto activo no es de naturaleza peptídica. Sin embargo, los

resultados mostrados en la **figuras 8 y 10** demuestran que dicho compuesto es sensible al tratamiento con proteinasa K y por tanto que es de estructura peptídica, además todo indica que el compuesto tiene un peso molecular aproximado de 3.2 kDa según la **figura 12 y 14**, por lo general los antimicrobianos naturales no peptídicos tienen un peso inferior a 1 kDa (Marshall & Arenas, 2003) por tanto es necesario acudir a otras pruebas experimentales como conocer el espectro infrarrojo del compuesto y su masa molecular a fin de sumar nuevas evidencias que permitan dilucidar la naturaleza química del compuesto antimicrobiano. Un aspecto importante para tener en cuenta muestra que la fase móvil constituida por una mezcla volumétrica de: butanol: ácido acético: agua (5:1:2) permitió una adecuada separación cromatográfica del compuesto activo. Por este motivo se recomienda en estudios posteriores, el empleo de esta fase móvil en la separación cromatográfica mediante placas de gel de sílica del metabolito antimicrobiano producido por la cepa 29. El compuesto activo presenta una fluorescencia de color verde muy intensa al ser excitado bajo luz ultravioleta  $\lambda = 250$  nm (**Fig. 17, 18 y 19**). Ciertos compuestos carbonílicos alifáticos, alicíclicos y estructuras de dobles enlaces fluorescen. No obstante, la mayoría de los compuestos naturales fluorescentes contienen anillos aromáticos (Duval & Duplais, 2017). Por tanto, si el compuesto es un péptido antimicrobiano es muy posible que contenga en su estructura aminoácidos aromáticos que le confieren fluorescencia intrínseca. Además, resultados como el mostrado en la **figura 12** indican que el compuesto activo puede presentar afinidad por una proteína extracelular expresada por la cepa 29, que pudiera ser incluso una molécula protectora o potenciadora de la actividad antimicrobiana, dicha afinidad puede ser causada por diferencias de cargas entre la proteína y el compuesto activo. Se ha descrito que ciertas moléculas interactúan con las bacteriocinas y se organizan para formar agregados moleculares que se unen a la superficie de la bacteria blanco (Moreira, 1993; Diep & Nes, 2002). El presente fenómeno resulta incentivo como objeto de estudio de futuras investigaciones biotecnológicas.

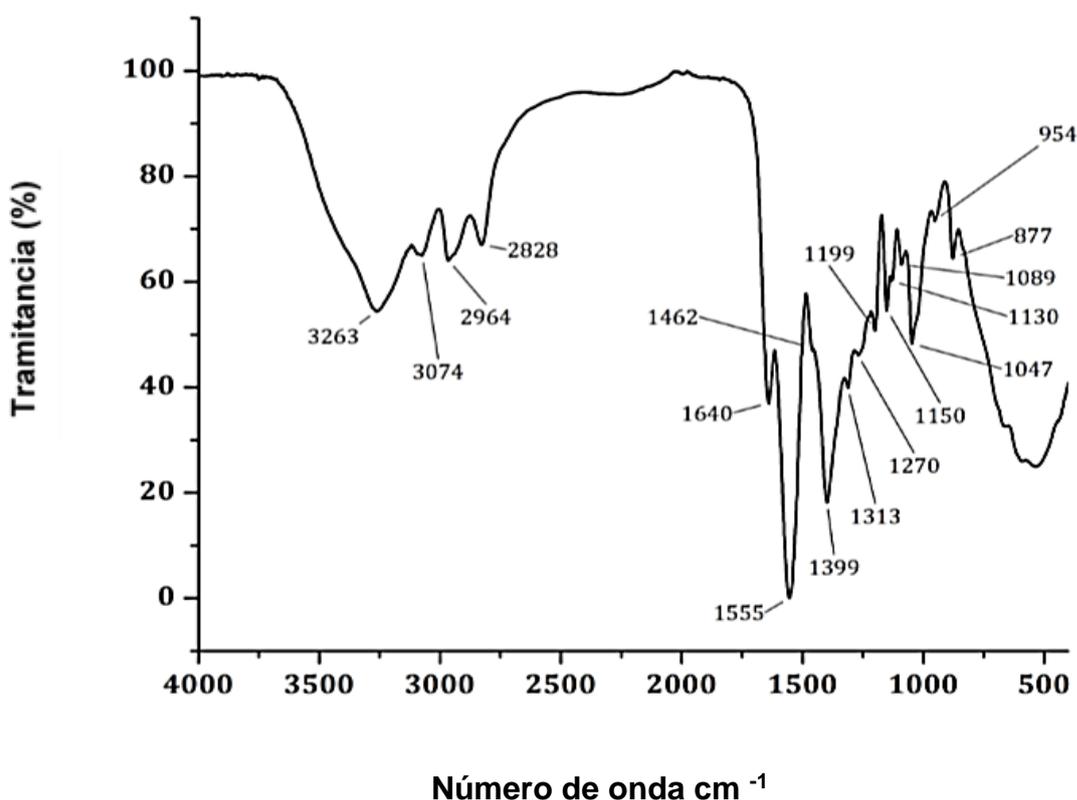
## 5.7. Caracterización estructural



**Figura 25.** Espectro infrarrojo medio del compuesto antimicrobiano producido por la cepa 29 (rojo). Espectro infrarrojo medio del compuesto antimicrobiano (azul) reportado por Messaoudi *et al.* (2015).

Messaoudi *et al.* (2015) informaron encontrar un compuesto antimicrobiano producido por una cepa marina de *Spirillospora* sp. En la **figura 25** se muestra el espectro infrarrojo del compuesto antimicrobiano documentado por estos autores (línea azul), comparado con el espectro infrarrojo del compuesto antimicrobiano producido por la cepa 29 (línea roja). Es posible apreciar una marcada similitud entre las señales de ambos espectros. Además, teniendo en cuenta que en ambos casos los compuestos son aislados de cepas de actinobacterias, presentan fluorescencia bajo la incidencia de luz ultravioleta a  $\lambda=250$  nm y ambos compuestos antimicrobianos muestran selectividad para bacterias Gram-positivas. Estas evidencias llevan a pensar que tal vez se trate del mismo compuesto. No obstante, Messaoudi *et al.* (2015) no reportan la estructura química del compuesto al que pertenece el espectro infrarrojo (azul) mostrado en la **figura 25**. A pesar de

que el espectro infrarrojo del compuesto producido por la cepa 29 revela la presencia de enlaces amida, no es suficiente evidencia para admitir que la muestra analizada sea un péptido. Siguiendo esta estructura lógica se encuentra que Orocio (2013) documentó el espectro infrarrojo de un compuesto de origen sintético denominado dendrímero PAMAM (**Fig. 26**).



**Figura 26.** Espectro infrarrojo medio para el dendrímero PAMAM reportado por Orocio, 2013.

Al comparar el espectro infrarrojo del dendrímero PAMAM y el espectro infrarrojo del compuesto producido por la cepa 29 se observa una considerable similitud (**Fig. 25 y 26**), tanto en la presencia de grupos funcionales, intensidad y desplazamiento de las señales, con excepción de la señal ubicada en  $3358\text{ cm}^{-1}$  que seguramente corresponde a grupos hidroxilo y pertenece al espectro infrarrojo del compuesto producido por la cepa 29 (**Fig. 25**). Los dendrímeros PAMAM son compuestos constituidos a base de aminas y amidas que poseen superficies aniónicas en forma de grupos carboxilos (Orocio, 2013). Por tanto si el compuesto producido por la cepa 29 tiene alguna similitud estructural con un dendrímero se puede explicar la carga negativa que evidencia el compuesto de interés por la

presencia de grupos carboxilos siendo posible fraccionar dicho compuesto usando una columna de intercambio aniónico (**Fig. 15**), además el enlace amida es el principal enlace en la estructura química de un dendrímero y probablemente puede convertirse en blanco de acción de la proteinasa K en determinadas regiones que la enzima pueda reconocer como análogos de aminoácidos. También cabe la posibilidad que el compuesto tenga una parte peptídica que constituya la región de corte de la proteasa. Otra reflexión interesante es que los dendrímeros son polímeros ramificados con geometría globular por tanto es posible presumir que puedan presentar una conformación nativa y otra desnaturalizada, así como formar agregados moleculares difíciles de disgregar, similar a determinados agregados de proteínas, en concordancia y bajo el supuesto que el compuesto antimicrobiano producido por la cepa 29 es una macromolécula polimérica de estructura química similar a un dendrímero, se pudiera explicar el comportamiento descrito en la **figura 12**, donde se observan dos zonas de inhibición y se discute con más detalle en punto 4.3.1. En el presente apartado sólo analizamos la región media del espectro infrarrojo, debido a que es la zona que proporciona la mayor cantidad de información para compuestos orgánicos y las aproximaciones elaboradas a partir de la comparación de los espectros infrarrojos están fundadas conforme a toda la evidencia recabada hasta el momento en esta investigación, sin embargo, los resultados espectroscópicos (**Fig. 21**) muestran que la sustancia activa es una mezcla de al menos cuatro compuestos, el comportamiento cromatográfico y electroforético permiten inferir que comparten características tanto de peso molecular como de polaridad similares, existen reportes bibliográficos de familias de compuesto con características (formula molecular, PM, polaridad) similares con tiempos de retención muy próximos o mezclas de isómeros (mezclas racémicas) que son difíciles de separar, ya que sus propiedades químicas y físicas son si no iguales, muy similares, lo que da origen en muchas ocasiones a bandas cromatográficas muy anchas en el caso de TLC o picos cromatográficos muy amplios y en el mejor de los casos muy cercanos (E. Gil-Av & V. Schurig, 1994). En la revisión bibliográfica sobre compuestos activos de origen bacteriano específicamente de *Streptomyces*, se encontró un trabajo donde son producidos una serie de compuestos derivados del Dinactin, este compuesto y sus aductos  $\text{NH}_4^+\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , muestra patrones similares de fraccionamiento en sus espectros de masas a los

observados para los C1 y C2, con un peso molecular de 803.55 (Shaaban et al., 2014). El Dinactin es un macrólido (polieter) con un espectro FTIR similar al obtenido para la mezcla, por lo que sugerimos que en la muestra activa obtenida en este trabajo exista Dinactin y algunos de sus derivados, esto justificaría porque el compuesto activo no dio positivo (TLC) a la ninhidrina, ya que no contiene aminoácidos, ni nitrógeno en su molécula, sin embargo es un anillo con dobles enlaces, lo que justificaría su fluorescencia bajo luz ultravioleta, sin dejar de lado la posibilidad de que la mezcla contenga algún péptido.

## **5.8. Identificación taxonómica y de la NRPS**

### **5.8.1. Identificación de la NRPS**

La inmensa complejidad estructural y la diversidad funcional de los péptidos no ribosómicos dificultan la identificación de estos metabolitos. La incorporación de monómeros de aminoácidos en los péptidos a través de las sintetasas de péptidos no ribosómicos se logra a través de los dominios de condensación, la proteína transportadora de peptidilo y el dominio de adenilación (A) asociados con la enzima (Fischbach & Walsh, 2006). Estudios previos demuestran que un análisis de secuencias relacionadas con el dominio (A) de adenilación proporcionan una evaluación bioinformática del potencial biosintético de una cepa determinada para la producción de péptidos no ribosomales (Fischbach & Walsh, 2006). En el presente trabajo se emplearon dos pares de oligonucleótidos degenerados (A2F/A3R y A3F/A7R) para amplificar regiones de los dominios (A) de adenilación asociados con las sintetasas de péptidos no ribosomales. Del total de 75 cepas, 10 mostraron productos de PCR verificados para la presencia de sintetasa de péptidos no ribosomales (**Fig. 19**). A pesar de secuenciar 10 productos de PCR, sólo uno correspondiente a la cepa 11 fue posible alinearlo en Blast y encontrar resultados relacionados con la síntesis de SPNR en el resto de los casos no se obtuvo resultado producto de la alineación, este fenómeno sugiere que las secuencias no tenían una adecuada calidad. Además, en muchos casos los oligonucleótidos degenerados subestiman la diversidad de secuencias NRPS dentro de cepas individuales debido a que no amplifican el 100% de los loci presentes en la secuencia del genoma de las cepas evaluadas y en algunos casos puede ocurrir amplificación inespecífica. Esta limitación se debe, al menos en

parte, a la complementariedad insuficiente del cebador, principalmente cuando son cebadores degenerados (Tambadou *et al.*, 2014). Las cepas que resultaron positivas incluyen representantes de géneros tradicionalmente asociados con la producción de diversos metabolitos secundarios (**Tabla 3**). No se observó una correlación entre la actividad antimicrobiana de una cepa individual y la presencia de genes NRPS en el genoma de la cepa, esta evidencia sugiere que es posible dirigir investigaciones al estudio de mecanismos moleculares involucrados en activar la biosíntesis de estos metabolitos codificados en el genoma bacteriano de los aislados sin fenotipo antimicrobiano (Maciejewska *et al.*, 2016). Las cepas 29 y 65 con características antimicrobianas resultaron positivas a una amplificación con el oligonucleótido A2F/A3R. Sin embargo, en el transcurso de la investigación no hubo evidencia que vincule a las cepas mencionadas con la producción de péptidos antimicrobianos no ribosomales. En la **tabla 1** se observan los porcentajes efectivos para 11 secuencias reportadas en el NCBI las cuales muestran valores muy bajos siendo el mayor de 30%. Valores bajos del porcentaje efectivo de la secuencia comparada se pueden explicar de diferentes maneras. Por ejemplo, que las secuencias comparadas son cortas, que la secuencia a comparar es grande pero la secuencia del GenBank es corta o que las secuencias difieren mucho entre sí y sólo una pequeña parte de ellas se puede comparar. Cuanto menor es este valor significa que se alinean menos nucleótidos y por tanto el error en cuanto a la alineación es mayor (Tambadou *et al.*, 2014). Al analizar los porcentajes de identidad también se observa que muestran valores por debajo del 78.01% lo que sugiere que la secuencia a comparar presenta un moderado porcentaje de identidad respecto a las reportadas en el NCBI, esta evidencia sugiere que dicha secuencia puede ser novedosa respecto a las documentadas actualmente. Al consultar la literatura se deriva que un valor de identidad entre secuencias por debajo del 60% se considera un valor bajo (Tambadou *et al.*, 2014; Müller *et al.*, 2015). Según cuando las secuencias comparadas comparten una identidad de aminoácidos del 85% o un valor superior se considera que son loci homólogos de rutas caracterizadas experimentalmente y en estudios de análisis químico es posible detectar compuestos idénticos o estrechamente relacionados con los producidos por las rutas caracterizadas. Los porcentajes de identidad de las secuencias representadas en la **tabla 1** se encuentran entre 72.14 y 78.01% siendo valores inferiores al 85% pero no muy distantes, no obstante, todas las

secuencias mostradas en la **tabla 1** presentan un bajo porcentaje efectivo de secuencia comparada y es de subrayar que el mayor valor encontrado es del 30%. Las tres primeras secuencias son las que muestran mayores valores de porcentaje efectivo de secuencia comparada sin embargo las tres son de origen terrestre, esta evidencia sugiere que posiblemente la secuencia de NRPS de la cepa 11 sea novedosa y consecuentemente este microorganismo tenga el potencial para producir un péptido no ribosomal nuevo respecto a los reportados hasta la actualidad (Komaki *et al.*, 2012; Maciejewska *et al.*, 2016). En la bibliografía consultada no encontramos un criterio unificado en cuanto a un valor de porcentaje de identidad a tener en cuenta para seleccionar una secuencia como posiblemente novedosa. Müller *et al.* (2015) y Tambadou *et al.* (2014) hacen referencia a considerar tentativamente un valor de identidad inferior a 60% como bajo. Mientras que autores como Gotang *et al.* (2010), destacan que valores de identidad del 85% puede ser un buen punto de partida para fijar el nivel de similitud de secuencia que se puede utilizar para hacer predicciones sobre los productos del metabolismo secundario. Es de resaltar que además del porcentaje de similitud es importante tener en cuenta el porcentaje efectivo de la secuencia comparada, así como el origen y tamaño de esta a fin de poder emitir un criterio más acertado en cuanto a considerar una secuencia como posiblemente novedosa. Las vías asociadas con la biosíntesis de metabolitos secundarios están ampliamente distribuidas entre las actinobacterias y los análisis bioinformáticos proporcionan un método de bioprospección que tiene considerable potencial para mejorar la eficiencia de descubrimiento de nuevos metabolitos bioactivos previo a ensayos de fermentación y estudios químicos (Gotang *et al.*, 2010; Tambadou *et al.*, 2014).

### **5.8.2. Identificación taxonómica y caracterización bioquímica**

La identificación taxonómica de cepas bioactivas y de los microorganismos en una colección es una tarea imprescindible para toda investigación de bioprospección. Sin embargo, de acuerdo con la disposición de los recursos, esta tarea se desarrolla gradualmente, priorizando las cepas que presentan potencialidades. La identificación taxonómica de 16 del total de 75 cepas (**Tabla 2**) se llevó a cabo mediante el análisis de secuencias del gen 16S del ARN ribosomal. El porcentaje

de divergencia entre secuencias donde se emplea el gen ARNr 16S indican que los valores menores al 98% hacen referencia a posibles nuevas especies (Bou *et al.*, 2011). Las 16 cepas representadas en la **tabla 2** presentaron porcentajes de identidad mayores al 99.67%, esto indica que no se tratan de especies nuevas. Las actinobacterias son un grupo taxonómico muy diverso y variado entre sí, siendo difícil diseñar un sistema de oligonucleótidos que logren amplificar todas las muestras de una colección, por tanto, es recomendable usar más de un par de oligonucleótidos con este fin (Farris & Olson, 2007; Schäfer *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta este precedente en este trabajo se emplearon dos pares diferentes de oligonucleótidos y aunque sólo se sometieron 16 cepas apartadas del total de 75 a un PCR con fines taxonómicos, cabe resaltar que fue posible identificarlas. Es importante señalar que es difícil conocer con certeza si todas las cepas identificadas tienen un origen marino debido a que está documentado que muchos aislados microbianos marinos pueden haberse originado en ambientes terrestres y existen investigaciones que comunican sobre algunos actinomicetos terrestres y su alta tolerancia a medios salinos (Yang, 2013). Este hecho hace que en muchos casos resulte difícil determinar si microorganismos marinos son verdaderamente autóctonos de este ambiente. Doce de las 16 cepas identificadas pertenecen al género *Streptomyces* sp siendo el más representado. Las características morfológicas de las cepas representadas con los números 29, 65 y 66 (**Fig. 19**) son distintivas del género *Streptomyces* sp. el cual abarca a más de 500 especies de bacterias Gram-positivas y filamentosas, las cuales hacen parte del Phylum Actinobacteria, Orden Streptomyetales. El género *Streptomyces* se caracteriza por la producción de compuestos con actividades biológicas diversas (Gontang *et al.*, 2007). La caracterización bioquímica de las cepas 29, 65 y 66 evidencia una gran producción de enzimas extracelulares (**Tabla 3**). *Streptomyces* es un grupo importante de bacterias saprófitas, capaces de producir una amplia variedad de enzimas importantes en la degradación de la materia orgánica compleja a compuestos simples lo cual favorece una mayor asimilación de nutrientes por parte de las células (León *et al.*, 2011) y por lo tanto destaca el papel importante del género *Streptomyces* sp en ciclos biogeoquímicos en el océano (Gotang, 2008).

## 5.9. Compilación y análisis de resultados

Mediante la metodología de crecimiento sobre membrana de celofán, se pudieron obtener filtrados de cultivos con actividad antimicrobiana para las cepas 29, 65 y 66. Sin embargo, no se detectó filtrado de cultivo bioactivo para las cepas 25, 27, 28, 32 y 33 siendo estas últimas positivas para el estudio de antagonismo mediante contacto directo. Este hallazgo reafirma que las cepas 29, 65 y 66 producen compuestos extracelulares en ausencia de una interacción directa contra las cepas de referencia y de origen humano evaluadas. Las cepas 29 y 65 contienen en su genoma secuencias relacionadas con el dominio A de la NRPS (**Fig. 1**) sin embargo en el presente trabajo no se encontraron evidencias de que la cepa 65 exprese péptidos antimicrobianos de origen no ribosomal. El hecho de que la cepa 66 no contenga en su genoma los genes relacionados con la NRPS sugiere que dicha cepa no presenta esta enzima y que por lo tanto no producen péptidos antimicrobianos no ribosomales. Además, al evaluar mediante hidrólisis enzimática los productos extracelulares bioactivos correspondientes a las cepas 29, 65 y 66 se encontró que únicamente el filtrado de cultivo de la cepa 29 perdió su actividad antimicrobiana, por tanto, es importante tener en cuenta que actualmente no se puede descartar la presencia de bacteriocinas o péptidos antimicrobianos no ribosomales como componentes de la mezcla activa, por este motivo se considera que posiblemente dicha cepa produce un compuesto sensible a una hidrólisis con proteinasa K. En el apartado 5.7 se sugiere que la muestra activa obtenida en este trabajo exista Dinactin y algunos de sus derivados sin dejar de lado la posibilidad de que la mezcla contenga algún péptido. Como se constató en esta investigación, la cepa 29 pertenece al género *Streptomyces* sp. Representantes de este género son capaces de producir una amplia variedad de metabolitos de importancia biotecnológica. Como resultado en la búsqueda de agentes antimicrobianos, estudios de antagonismo describen cepas de *Streptomyces* sp aisladas de sedimento marino y productoras de antibióticos (Magarvey *et al.*, 2004; Fenical & Jensen, 2006). En la bibliografía consultada se reportan múltiples investigaciones realizadas sobre especies de género *Streptomyces* de origen terrestre productoras de bacteriocinas potencialmente novedosas y con posibles aplicaciones biotecnológicas (Farris *et al.*, 2010; Völler *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2014; Gomes *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2019). Además, se

encuentran reportes escasos que documenten sobre otros géneros de actinobacterias marinas productoras de bacteriocinas, tal es el caso del estudio presentado por Chen *et al.*, (2017), donde estos autores presentan el descubrimiento de un nuevo antibiótico nombrado mathermicina, producido por una cepa de *Marinactinospora thermotolerans*. Conjuntamente resulta interesante el hecho de no encontrar bibliografía que describa cepas marinas de *Streptomyces* sp productoras de bacteriocinas. Muchos compuestos bioactivos derivados de microorganismos de género *Streptomyces* sp, se consideran seguros para uso biotecnológicos. El Comité de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos de Norteamérica denomina a muchos de los compuestos derivados de este género como *Generalmente Reconocidos como Seguros* (GRAS, *por sus siglas en inglés*) porque no se ha detectado que afecten la salud humana. Además, el género *Streptomyces* sp generalmente no está relacionado con la producción de toxinas (Dilipkumar *et al.*, 2011). No obstante, al observar la **figura 23 B** es posible apreciar que la cepa 29 produce una hemólisis alfa, que consiste en una lisis parcial de eritrocitos debido a la liberación de un producto de degradación de la hemoglobina llamado biliverdina. La reacción de hemólisis aporta elementos para una identificación presuntiva. Además de tener en cuenta que la capacidad hemolítica en los microorganismos se considera un factor de virulencia (Haubert *et al.*, 2017) por tanto, es necesario sumar evidencias a fin de emitir un criterio para el empleo de este microorganismo en la producción de la sustancia activa mediante el uso de biorreactores. Por consiguiente, surge la necesidad de caracterizar aún más determinados aspectos biológicos de la cepa 29 y de los compuestos antimicrobianos producidos por ella: propiedades bioquímicas, evaluar un mayor espectro antimicrobiano, mecanismo de acción del compuesto y secuenciación del genoma, para apoyar el uso de este microorganismo en la producción del compuesto activo, así como aportar elementos que coadyuven a comprender las posibles aplicaciones biotecnológicas de estos compuestos. En este sentido, estudios futuros deberán estar dirigidos a discernir las estructuras moleculares de los compuestos antimicrobianos producidos por la cepa 29, así como sus propiedades químicas y físicas, siempre teniendo presente que generalmente la estabilidad de los compuestos activos disminuye a medida que aumenta su purificación (Jamaluddin *et al.*, 2017). Las diversas aplicaciones biotecnológicas de los antimicrobianos pueden ser útiles tanto para humano como

para uso animal. En la actualidad, nuevos enfoques para el descubrimiento de productos naturales incluyen métodos tales como la exploración del genoma (Zhang *et al.*, 2003; Gotang *et al.*, 2010; Hodges *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2017). La presente investigación extiende y complementa estos conceptos con técnicas microbiológicas orientadas hacia la bioprospección de compuestos con actividad antimicrobiana brindando una metodología que exhibe la capacidad de biosíntesis de péptidos antimicrobianos de una colección de actinobacterias. Esta experiencia constituye un método de bioprospección rápido para priorizar algunas cepas con vistas a estudios futuros de fermentación y análisis químico. El resultado más destacable del presente estudio es la notoria actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas de una mezcla constituida por 4 compuestos, producidos por la cepa representada con el número 29 de género *Streptomyces* sp y que fue aislada de sedimento marino de la Bahía de la Paz, B.C.S., México. Los resultados de la actual investigación sugieren que los compuestos antimicrobianos producidos por la cepa 29 podrían ser de interés para la industria y la medicina. No obstante, el verdadero valor de estos compuestos exige inicialmente una identificación precisa de la estructura química del mismo.

## 6. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos mediante la metodología de doble capa y la prueba de contacto directo nos permitieron formar una perspectiva clara sobre las potencialidades antimicrobianas del total de 75 cepas de actinobacterias evaluadas para las pruebas de amensalismo y permitió seleccionar 8 cepas productoras de compuestos antimicrobianos dentro de las cuales sólo las cepas 29, 65 y 66 producen compuestos activos contra bacterias Gram-positivas y en ausencia de una interacción directa con el patógeno.
- Se determinó la presencia de genes asociados al dominio (A) de la NRPS en diez cepas. Las cepas 4, 5, 7, 11, 32 y 47 produjeron producto de PCR con el oligonucleótido A3F/A7R y las cepas 7, 13, 28, 29 y 65 con el oligonucleótido A2F/A3R.
- La cepa 29 y 65 con fenotipo antimicrobiano resultaron positivas a la presencia de NRPS, sin embargo, luego de una proteólisis enzimática de los productos extracelulares de las cepas 29, 65 y 66 se sugiere que solo la cepa 29 produce compuestos peptídicos sensibles al tratamiento con proteinasa K. Luego de someter los productos extracelulares de la cepa 29 a una técnica de bioautografía Tricina-SDS-PAGE se observó evidencias a favor de la presencia de un compuesto antimicrobiano de posible naturaleza peptídica y con un peso molecular aproximado de 3.2 kDa, a pesar de que el compuesto no se pudo teñir con azul brillante de Coomassie. Mientras que la bioautografía de TLC arrojó información en apoyo de no admitir la estructura peptídica del compuesto bioactivo ya que no fue posible su revelado con el reactivo de ninhidrina.
- La caracterización estructural del extracto antimicrobiano de la cepa 29 mostró que el mismo consiste en una mezcla de 4 compuestos con la presencia de enlaces amidas e imina, aunque la presencia de enlaces amida, no es suficiente evidencia para admitir que la muestra analizada sea un péptido. Sugerimos que en la muestra activa obtenida en este trabajo exista Dinactin y algunos de sus derivados sin descartar la posibilidad de que la mezcla contenga algún péptido.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aminake, M .N., S. Schoof, L. Sologub, M. Leubner & M. Kirschner (2011). Thiostrepton and derivatives exhibit antimalarial and gametocytocidal activity by dually targeting parasite proteasome and apicoplast. *Antimicrob Agents Chemother.* 55:1338-1348.
- Asusheyi, I., G. Iloegbulam, J. Olorunju & F. Oluwole (2012). Syntheses and Biological Activity of Some Derivatives of C-9154 Antibiotic. *Int. J. Med. Chem.* 40:1-7.
- Augustine, D., J. C. Jacob, K. D. Ramya, & R. Philip (2013). Actinobacteria from sediment samples of Arabian Sea and Bay of Bengal: Biochemical and physiological characterization. *Int. J. Res. Mar. Sciences.* 2(2):56-63.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith & K. Struhl (2002). Short protocols in molecular biology: A compendium of methods from current protocols in molecular biology. 5th Ed. John Wiley & Sons. Inc. P. 50.
- Ayuso, A., & O. Genilloud (2005). New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microb. Ecol.* 49:10-24.
- Ayuso, A., D. Clark, I. Gonzalez, O. Salazar, A. Anderson & O. Genilloud (2005). A novel actinomycete strain de-replication approach based on the diversity of polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase biosynthetic pathways. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67:795-806.
- Baltz, R. H. (2005). Antibiotic discovery from actinomycetes: will a renaissance follow the decline and fall? *SIM News.* 55:186-196.

- Baltz, R. H. (2006). Marcel Faber Roundtable: is our antibiotic pipeline unproductive because of starvation, constipation or lack of inspiration? *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33:507-513.
- Barcina, I., J. Iriberry & L. Egea (1987). Enumeration, isolation and some physiological properties of Actinomycetes from sea water and sediment. *System. Appl. Microbiol.* 10:85-91.
- Barja, J. L. (1979). Interrelaciones microbianas en el mundo marino, aislamiento y caracterización de un antibiótico producido por una bacteria marina. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, Madrid, España. 55 p.
- Baver, W., M. N. Kirby, J. C. Shenis & M. Turk (1966). Antibiotic susceptibility testing by standardised single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 493-96.
- Berrue, F., A. Ibrahim, P. Boland & R. Kerr (2009). Newly isolated marine biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *J. Appl. Microbiol.* 104:1675-1684.
- Banerjee, S. P., K. C. Dora & S. Chowdhury (2011). Detection, partial purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus brevis* FPTLB3 isolated from freshwater fish. *J. Food Science Technol.* 50(1):17-25.
- Botz, L., S. Nagy, B. Kocsis, & Sz. Nyiredy (2001). *Planar Chromatography*, Springer, Budapest. p. 489.
- Bou, G., A. Fernández-Olmos, C. García, J. A. Sáez-Nieto & S. Valdezate (2011). Métodos de identificación bacteria en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 29(8):601-608.
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3:238-250.

- Bull, A. T. & J. E. M Stach (2007). Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *T. Microbiol.* 15(11): 491-499.
- Cane D. E. & C. T. Walsh (1999). The parallel and convergent universes of polyketide synthetases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol.* 6:319-325.
- Cane D. E., C. T. Walsh & C. Khosla (1998). Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations. *Science.* 282:63–68.
- Carlucci, A. & D. Pramer (1961): Interacciones microbianas en el medio marino. *Appl. Microbiol.* 9:400-404.
- Castiglione F, A. Lazzarini, L. Carrano, E. Corti & I. Ciciliato (2008). Determining the structure and mode of action of microbisporicin, a potent lantibiotic active against multiresistant pathogens. *Chem Biol.* 15:22-31.
- Chen E., Q. Chen, S. Chen, B. Xu, J. Ju & H. Wang (2017). Mathermycin, un lantibiótico de los actinomicetos marinos *Marinactinospora thermotolerans* SCSIO 00652. *Appl. Environ. Microbiol.* 83(15).
- Choma I. M & E. M. Grzelak (2010). Bioautography detection in thin layer chromatography. *J. Chromatogr A.* 1218 (19): 2684-91.
- Crosa J. H. & C. T. Walsh (2002). Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66:223-249.
- Deraz, S. F., E. N. Karlsson, M. Hedström, M. M. Andersson & B. Mattiasson (2005). Purification and characterisation of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. *J. Biotechnol.* 117(4):343-354.

- Desriac, F., D. Defer, N. Bourgougnon, B. Brillet, P. L. Chevalier & Y. Flevry (2010). Bacteriocin as Weapons in the Marine Animal-Associated as an Aquaculture Probiotic. *Mar. Drugs* 8: 1153-1177.
- Diep, D. & I. Nes (2002). Ribosomally Synthesized Antibacterial Peptides in Gram Positive Bacteria. *Curr. Drug T.* 3(2):107-122.
- Dijksterhuis, J., M. Sanders, L. G. M., Gorris & E. J. Smid (1999). Antibiosis plays a role in the context of direct interaction during antagonism of *Paenibacillus polymyxa* towards *Fusarium oxysporum*. *J. Appl. Microbiol.* 86(1):13-21.
- Dilipkumar, M., M. Rajasimman & N. Rajamohan (2011). Application of statistical design for the production of inulinase by *Streptomyces* sp. using pressmud. *F. Chem S. Eng.* 5(4): 463-470.
- Diomedi, A. (2004). Nuevos antifúngicos: Las equinocandinas. *Rev. Chil. Infect.* 21:89-101.
- Dopazo, C. P., Lemos, M. L., Lodeiros, C., Bolinches, J., Barja, J. L., & A. E. Toranzo (1988). Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. *J. Appl. Bacteriol.* 65(2):97-101.
- Dündar, H., M. Atakay, Ö. Çelikbıçak, B. Salih & F. Bozoğlu (2014). Comparison of two methods for purification of enterocin B, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* W3. *P. Bioch. Biotechnol.* 45(8):796-809.
- Duval, R. & C. Duplais (2017). Fluorescent natural products as probes and tracers in biology. *Nat. Prod. Rep.* 34(2):161-193.
- Ebbensgaard, A., H. Mordhorst, M. T. Overgaard, C. G. Nielsen, F. Aarestrup & E. B. Hansen (2015). Comparative Evaluation of the Antimicrobial Activity of Different Antimicrobial Peptides against a Range of Pathogenic Bacteria. *PLoS ONE*.10:12.

- E. Gil-Av & V. Schurig (1994). Resolution of non-racemic mixtures in achiral chromatographic systems: a model for the enantioselective effects observed. *J. Chromatogr. A.* 666: 519-525.
- Ennahar S., T. Sashihara, K. Sonomoto & A. Ishizaki (2000). Class II a bacteriocins: biosynthesis, structure and activity, *FEMS Microbiol. Rev.* 24:85-106.
- Farris, M. H., & J. B. Olson (2007). Detection of Actinobacteria cultivated from environmental samples reveals bias in universal primers. *Lett. Appl. Microbiol.* 45(4):376-381.
- Farris, M. H., C. Duffy, R. H. Findlay & J. B. Olson (2010). *Streptomyces scopuliridis* sp. nov., un estreptomiceto del suelo productor de bacteriocina. *Rev. I. Microbiol Sistematic. Evol.* 61(9):2112-2116.
- Fenical, W. & P. R. Jensen (2006). Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nat. Chem. Biol.* 2(12):666-673.
- Ferir G, M. I. Petrova, G. Andrei, D. Huskens & B. Hoorelbeke (2013). The lantibiotic peptide labyrinthopeptin A1 demonstrates broad anti-HIV and anti-HSV activity with potential for microbicidal applications. *PLoS One.* 8: 64010.
- Fischbach, M. A. & C. T. Walsh (2006). Assembly-Line Enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: Logic, machinery and mechanisms. *Chem. Rev.* 106(8):3468-3496.
- García, J. A. & J. J. Picazo (1996). Microbiología Médica. *Microbiología Médica General.* Mosby, Madrid, España. 77-80 p.
- Gautier, M. J. (1976). *Alteromonas rubra*, a new marine antibiotic producing bacterium. *Inst. J. Sust. Bacteriol.* 26:459-66.

- Gillor O., A. Etzion & M. A. Riley (2008). The dual role of bacteriocins as anti-and probiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81:591-606.
- Ginolhac, A., C. Jarrin, B. Gillet, P. Robe, P. Pujic, K. Tüphile, H. Bertrand, T. M. Vogel, G. Perriere, P. Simonet & R. Nalin (2004). Phylogenetic analysis of polyketide synthase I domains from soil metagenomic libraries allows selection of promising clones. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5522-5527.
- Glenroy D. A., L.T. Tan, P. R. Jensen, R. E. Dimayuga, C. R. Fairchild, C. Raventos-Suarez & W. Fenical (2007). Marmycins A and B, cytotoxic pentacyclic C-glycosides from a marine sediment-derived Actinomycete related to the genus *Streptomyces*. *J. Nat. Prod.* 70:1406-1409.
- Gomes, K. M., R. S. Duarte & M. C. Freire Bastos (2017). Lantibiotics produced by Actinobacteria and their potential applications *Microbiology*.163:109-121.
- Gontang E. A., S.P. Gaudencio, W. Fenical & P.R. Jensen (2010). Sequence-based analysis of secondary-metabolite biosynthesis in marine actinobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:2487-2499.
- Gontang E. A., W. Fenical & P. R. Jensen (2007). Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:3272-3282.
- Gontang, E. A. (2008). Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria and their secondary metabolite genes. Tesis de Doctorado. Universidad de California, Estados Unidos. 163 p.
- Guina, T. E. C., H. Wang, M. Hackett & S. I. Miller (2000). A phop-regulated outer membrane protease of *Salmonella enterica* serovar typhimurium promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides. *J. Bacteriol.* 182:4077-4086.

- Hatalin, K. C., A. H. Marckley & E. Woodman (1973). Agar plate dilution method for routine antibiotic susceptibility testing in a hospital laboratory. *Am. J. Clin. Pathol.* 60:384-94.
- Haubert, L., I. S. Kroning, M. A. Iglesias & W. P. da Silva (2017). First report of the *Staphylococcus aureus* isolates from subclinical bovine mastitis in the South of Brazil harboring resistance gene *dfrG* and transposon family Tn 916-1545. *Microb. Patho.* 113:242-247.
- Haydock, S. F., T. Mironenko, H. I. Ghoorahoo & P. F. Leadlay (2004). The putative elaiophyllin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. DSM4137 is adjacent to genes encoding adenosyl cobalamin-dependent methylmalonyl CoA mutase and to genes for synthesis of cobalamin. *J. Biotechnol.* 113:55-68.
- Hécharde Y. & H. G. Sahl (2002). Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie.* 84:545-557.
- Hernández L. G., T. Rivas, M. Romero, C. J. Chiquito, F. H. Ruiz & R.G Chiquito (2018). Potencial antagónico de bacterias y levaduras marinas para el control de hongos fitopatógenos. *Rev. Mexicana cien. agríc.* 9:4311-4321.
- Hodges T. W., M. Slattery & J. B. Olson (2012). Unique actinomycetes from marine caves and coral reef sediments provide novel PKS and NRPS biosynthetic gene clusters. *Mar Biotechnol.* 14:270-280.
- Holtsmark I., D. Mantzilas, V. G. H. Eijsink & M. B. Brurberg (2006). Purification, characterization, and gene sequence of michiganin A, an actagardine-like lantibiotic produced by the tomato pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:5814-5821.
- Jamaluddin, N., D. C. Stuckey, A. B. Ariff & F. W. Wong (2017). Novel approaches to purifying bacteriocin: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1-13.

- Jiménez, D. P. (2011). Aislamiento y caracterización preliminar de genes de policétido sintetasas tipo I en actinomicetos aislados a partir de hormigas cortadoras de hojas *Atta cephalotes*. Tesis de Doctorado. Universidad Industrial de Santander, Colombia. 109 p.
- Kelecom, A. (2002). Secondary metabolites from marine microorganisms. *An. Acad. Bras. Cienc.* 74(1):151-70.
- Keller-Costa, T., A. Jousset, L. van Overbeek, J. D. van Elsas & R. Costa (2014). The Freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis* Harbours diverse *Pseudomonas* species (Gammaproteobacteria, Pseudomonadales) with broad-spectrum antimicrobial activity. *PLoS One.* 9:(2).
- Kim, T. K., A. K. Hewavitharana, P. N. Shaw & J. A. Fuerst (2006). Discovery of a new source of rifamycin antibiotics in marine sponge actinobacteria by phylogenetic prediction. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:2118-2125.
- Komaki, H., N. Ichikawa, A. Oguchi, T. Hanamaki & N. Fujita (2012). Genome-wide survey of polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase gene clusters in *Streptomyces turgidiscabies* NBRC 16081. *J Gen Appl Microbiol.* 58(5):363-372.
- Kwon H. C., C. A. Kauffman, P. R. Jensen & W. Fenical (2006). Marinomycins A-D, antitumor-antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus *Marinispora*. *J. Am. Chem. Soc.* 128:1622-1632.
- Lam K. S. (2006): Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Curr Opin Microbiol.* 9:245-251.
- Ledermann, W. (2013). Microbial antagonism in the therapy of infectious diseases. *Rev. Chil. Infectol.* 4:446-50.

- Lee N. K., E. J. Han, K. J. Han & H. D. Paik (2013). Antimicrobial Effect of Bacteriocin KU24 produced by *Lactococcus lactis* KU24 against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Food Sci.* 78(3): 465-469.
- Lee, L.-H., N. Zainal, A. S. Azman, S. K. Eng, N. S. Ab Mutalib, W. F. Yin & K. Chan (2014). *Streptomyces pluripotens* sp. nov., un estreptomiceto productor de bacteriocina que inhibe el *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. *Rev. I. Microbiol. Sistem. Evol.* 64(9):3297-3306.
- Lemos M. L., C. P. Dopazo, A. E. Toranzo & J. L. Baraja (1991). Competitive dominance of antibiotic producing marine bacteria in mixed cultures. *J. Appl. Bacteriol.* 71:228-32.
- León, J., L. Liza, I. Soto, M. Torres & A. Orosco (2011). Bacterias marinas productoras de compuestos antibacterianos aisladas a partir de invertebrados intermareales. *Rev. perú. med. exp. salud pública.* 27(2).
- Li, J. W. H. & J. C. Vederas (2009). Drug discovery and natural products: ¿end of an era or an endless frontier? *Science.* 325:161-165.
- Lv, X., L. Miao, H. Ma, F. Bai, Y. Lin, M. Sun, & J. Li (2017). Purification, characterization and action mechanism of plantaricin JY22, a novel bacteriocin against *Bacillus cereus* produced by *Lactobacillus plantarum* JY22 from golden carp intestine. *F. S. Biotechnol.* 27(3):695-703.
- Maciejewska, M., D. Adam, L. Martinet, A. Naômé, M. Całusińska, P. Delfosse & S. Rigali (2016). A Phenotypic and Genotypic Analysis of the Antimicrobial Potential of Cultivable *Streptomyces* Isolated from Cave Moonmilk Deposits. *Front. Microbiol.* 7.
- Magarvey, N. A., J. M. Keller, V. Bernan, M. Dworkin & D. H. Sherman (2004). Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:7520-7529.

- Maldonado L. A., D. Fragoso, A. Perez, J. Druker & E. T. Quintana (2009). Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico. *A.V. Leeuw.* 95:111-120.
- Maldonado L., W. Fenical, P. R. Jensen, C. Kauffman, T. Mincer, A. Ward, A. Bull & M. Goodfellow (2005). *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae*. *Int J Syst Evol Micr.* 55:1759-1766.
- Malik, K. A. (1991). Maintenance of Microorganisms by simple methods. En: Maintenance of Microorganisms and Cultured cells. A Manual of Laboratory Methods. B. E. Kirsopy A. Doyle (Eds). Academic Press, Londres 29-32.
- Mansson M., L. Gram & T. O. Larsen (2011). Production of bioactive secondary metabolites by marine vibronaceae. *Mar Drugs.* 9:1440-1468.
- Marshall S. H. & G. Arenas (2003). Péptidos antimicrobianos: una alternativa natural a los antibióticos químicos y un potencial para la biotecnología aplicada. *Rev. Elect. Biotecnol.* 6(3).
- Matsubara, V. H., Y. Wang, H. M. Bandara, M. P. A. Mayer & L. P. Samaranayake (2016). Probiotic lactobacilli inhibit early stages of *Candida albicans* biofilm development by reducing their growth, cell adhesion, and filamentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100(14):6415-6426.
- Mayr-Harting, A., A. J. Hedges & R. C. W. Berkeley (1972). Chapter VII Methods for Studying Bacteriocins. *Meth. Microbiol.* 315-422.
- Messaoudi, O., M. Bendahou, I. Benamar & D. E. Abdelwouhid (2015). Identification and preliminary characterization of non-polyene antibiotics secreted by new strain of actinomycete isolated from sebkha of Kenadsa, Algeria. *As. Pac. J. Trop. Biome.* 5(6):438-445.

- Mincer T. J., P. R. Jensen, C. A. Kauffman & W. Fenical (2002). Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycetotaxon in ocean sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5005-5011.
- Moreira W. L. (1993). Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus* sp. 347, de origen cárnico. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid, España. 310 p.
- Müller, C. A., L. Oberauer-Wappis, A. Peyman, G. C. A. Amos, E. M. Wellington & G. Berg (2015). Mining for nonribosomal peptide synthetase and polyketide synthase genes revealed a high level of diversity in the Sphagnum Bog Metagenome. *Appl. Environ. Microbiol.* 81(15): 5064–5072.
- Muriana P. K. & T. R. Klaenhammer (1991). Purification and partial characterization of Lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(1):114-121.
- Ong, Z. Y., J. Cheng, Y. Huang, K. Xu, Z. Ji, W. Fan & Y. Yang (2014). Effect of stereochemistry, chain length and sequence pattern on antimicrobial properties of short synthetic  $\beta$ -sheet forming peptide amphiphiles. *Biomaterials.* 35(4):1315-1325.
- Orocio. E. (2013). Síntesis y evaluación in vitro en células de cáncer ar42j del radiofármaco <sup>99m</sup>Tc-Tyr3-octreótido dendrímero análogo de la somatostatina. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México. 80 p.
- Passari, A. K., V. K. Mishra, G. Singh, P. Singh, B. Kumar & V. K. Gupta (2015): Insights into the functionality of endophytic actinobacteria with a focus on their biosynthetic potential and secondary metabolites production. *Sci. Rep.* 7: 11809
- Pelaez, F. (2006). The historical delivery of antibiotics from microbial natural products can history repeat? *Biochem. Pharmacol.* 71:981-990.

- Pérez, G., G. M. Lugioyo & D. Cárdenas (2001). Identificación de bacterias aisladas de aguas oceánicas cubanas y sus capacidades antimicrobianas. Rev. Elect. Instituto Oceanología. Cuba.
- Petsch, P. (1998). Proteinase K digestion of proteins improves detection of bacterial endotoxins by the *Limulus amoebocyte* assay: Application for endotoxin removal from cationic proteins. Anal. Biochem. 259 (42).
- Prada, L. (2013). Identificación de ácidos orgánicos causantes de la solubilización de fósforo inorgánico sintetizados por actinomicetos aislados de suelos en los andes orientales colombianos. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Colombia. 70 p.
- Rice, L. B. (2008). Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. J. Infect. Dis. 197(8):1079-81.
- Richard A. S., A. Zhang, S. J. Park, M. Farzan & M. Zong (2015). Virion associated phosphatidylethanolamine promotes TIM1-mediated infection by Ebola, dengue, and West Nile viruses. Proc Natl Acad Sci USA. 112:14682-14687.
- Riley M .A. & J .E. Wertz (2002). Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. Biochimie. 84:357-364.
- Roth P. B., C. M. Mikulski & G. J. Doucette (2008). Influence of microbial interactions on the susceptibility of *Karenia* spp. to algicidal bacteria. Aquat Microb Ecol. 50:251-259.
- Sambrook, J. & D. W. Russell (2001). Molecular Cloning: A laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 2344 p.
- Schäfer, J., U. Jäckel & P. Kämpfer (2010). Development of a new PCR primer system for selective amplification of Actinobacteria. FEMS Microbiol Lett. 311:103-112.

- Segarra, J. (1997). De antibiosis a antibioticoterapia: Una realidad fármaco-ecológica. *Llull*. 20:311-31.
- Shaaban, K., S. Singh, S. Elshahawi & C. Venturicidin (2014). A new 20-membered macrolide produced by *Streptomyces* sp. TS-2-2. *J Antibiot*. 67:223–230.
- Shai, Y. (2002). Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers*. 66:236-248.
- Shetty, P. R., S. K. Buddana, V. B. Tatipamula, Y. V. Naga & J. Ahmad (2014). Productio of polypeptide antibiotic from *Streptomyces parvulus* and its antibacterial activity. *Br. J. Microbiol*. 45(1): 303-312.
- Shunyan J., L. Shuqin, Z. Chunjiang & W. Changxin (2016). Developing Protocols of Tricine-SDS-PAGE for separation of polypeptides in the mass range 1-30 kDa with minigel electrophoresis system. *Int. J. Electrochem. Sci*. 11:640: 649.
- Sieber S. A. & M. A. Marahiel. (2005): Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics. *Chem. Rev*. 105: 715-738.
- Singh, M., Chaudhary, S. & D. Sareen (2019). Roseocin, a novel two-component lantibiotic from an Actinomycete. *Mol. Microbiol*. 113(2):326-337.
- Smith, R. L. & T. M. Smith (2001). *Ecología*. Addison Wesley. Pearson. Educación. p. 664.
- Sperstad, S., T. Haug, H. Blencke & K. Stensvag (2011). Antimicrobial peptides from marine invertebrates: Challenges and perspectives in marine antimicrobial peptide discovery. *Biotechnol. Adv*. 29(5):519-30.
- Staby, A. R. Jensen, M. Bensch, J. Hubbuch, D. Dünweber & J. Krarup (2007). Comparison of chromatographic ion-exchange resins VI. Weak anion-exchange resins. *J Chromatogr A*. 1164:82-94.

- Stach, J. E. M., L. A. Maldonado, A. C. Ward, M. Goodfellow & A. T. Bull (2003). New primers for the class *Actinobacteria*: application to marine and terrestrial environments. *Env. Microbiol.* 10:828-884.
- Subramani, R. & W. Aalbersberg (2012). Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiol. Res.* 167(10):571-580.
- Subramani, R. & D. Sipkema (2019). Marine rare actinomycetes: A promising source of structurally diverse and unique novel natural products. *Marine Drugs.* 17(5): 249.
- Sugesh S. & P. Mayavu (2013). Antimicrobial activities of two edible bivalves *M. meretrix* and *M. casta*. *Pakistan J. Biol. Sci.* 16:38-43.
- Tambadou, F., I. Lanneluc, S. Sablé, G. Klein, I. Doghri, V. Sopéna & R. Chevrot (2014). Novel nonribosomal peptide synthetase (NRPS) genes sequenced from intertidal mudflat bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 357(2):123-130.
- Tortora, G. J., B. R. Funke & C. L. Case (2001). *Microbiology: an introduction*. Benjamin Cummings, San Francisco, EE UU. 1:887.
- Watve, M. G., R. Tickoo, M. Jog & B. D. Bhole (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch. Microbiol.* 176:386-390.
- Wawrik, B., D. Kudiev, U. A. Abdivasievna, J. J. Kukor, G. J. Zystra & L. Kerkhof (2007). Biogeography of actinomycete communities and type II polyketide synthase genes in soils collected in New Jersey and Central Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:2982-2989.
- Wawrik, B., L. Kerkhof, G.J. Zylstra & J. J. Kukor (2005). Identification of unique type II polyketide synthase genes in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2232-2238.
- Williams, S. T. & J. C. Vickers (1986). The ecology of antibiotic production. *Microbiol Ecology.* 12:43-52.

- Yamamoto Y., Y. Togawa, M. Shimosaka & M. Okazaki (2003). Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain RJ-11. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(10): 5746-5753.
- Yang, C. (2013). Isolation, phylogenetic analysis and antibiotic activity screening of red sea-sponge-associated Actinobacteria. Tesis de maestría. Universidad de Thuwal, Arabia Saudita. 52 p.
- Zhang X., C. A. Clark & G. S. Pettis (2003). Interstrain inhibition in the sweet potato pathogen *Streptomyces ipomoeae*: purification and characterization of a highly specific bacteriocin and cloning of its structural gene. *Appl. Environ. Microb.* 69(4):2201-2208.

# ANEXO

Clave empleada en el presente trabajo	Clave original del cepario	Clave empleada en el presente trabajo	Clave original del cepario
1	208 PA	39	355 PI-A
2	209 PA	40	213 ES
3	510 PA	41	9 PA
4	511 PI	42	27 ES
5	374 MCA	43	28 PA
6	563 MC	44	33 PI
7	423 PA	45	28 PI
8	409 PI	46	8 PI
9	329 PI	47	111 ES
10	426 MCA	48	12 ES
11	115 PA	49	20 PI
12	8 PIA	50	12 PI
13	800 MC	51	850 MC
14	329 MC	52	18 PI
15	313 MCB	53	350 ES
16	9 ES	54	602 PA
17	378 MCB	55	428 MC
18	26 ES	56	316 MC
19	900 MC	57	326 PI
20	566 MC	58	346 MC
21	333 MC	59	730 MC
22	329 MC	60	3 ES
23	350 ES	61	323 PI
24	321 PA	62	320 PA
25	405 PI	63	327 PI
26	364 MC	64	42 ES
27	805 PA	65	517 PI
28	215 PA	66	509 PI
29	515 PI	67	422 MC
30	310 PI	68	419 MC
31	402 PI	69	313 ES
32	422 PA	70	701 PI
33	109 PI	71	702 PI
34	324 PI	72	610 PA
35	804 MC	73	550 PA
36	328 MC	74	551 PA
37	323 PA	75	421 MC
38	427 MC		