

Evaluación de la Capacidad Inhibitoria de Actinomicetos Aislados de Bosque Húmedo del
Departamento de Nariño sobre Bacterias Patógenas Resistentes a Antibióticos (*Escherichia Coli*
Y Staphylococcus Aureus)

Autor

Luis Alberto Ortega Bastidas

Universidad de Nariño

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Programa de Biología

San Juan de Pasto 11 de Julio de 2019

Evaluación de la Capacidad Inhibitoria de Actinomicetos Aislados de Bosque Húmedo del
Departamento de Nariño sobre Bacterias Patógenas Resistentes a Antibióticos (*Escherichia Coli*
Y Staphylococcus Aureus)

Asesores:

Edith Mariela Burbano Rosero Doctora en Ciencias

Roger David Castillo Arteaga Magister en Microbiología

Universidad de Nariño

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Programa de Biología

San Juan de Pasto 11 de Julio de 2019

“Las ideas y conclusiones aportados en el trabajo de grado, son responsabilidad exclusiva de los autores”

Artículo 1° del acuerdo N° 324 de octubre 11 de 1966 emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación

94.65

Directores

Edith Mariela Burbano Rosero PhD

Roger David Castillo Arteaga PhD

Jurados

Simone Ichiwaki PhD.

Mario Benavides Rosero PhD.

San Juan De Pasto, Septiembre 03 De 2019

AGRADECIMIENTOS

A mi madre por todo el fuerza, amor y dedicación dados en el transcurso de mi vida y mis estudios.

A mi familia por acompañarme, apoyarme, colaborarme y construirme en cada paso de mi vida.

A mis asesores, la Doctora Edith Mariela Burbano Rosero y el Doctor Roger David Castillo Arteaga por sus enseñanzas, acompañamiento, sugerencias, apoyo, motivación y paciencia en el desarrollo de la investigación. Por ser parte de mi formación como Biólogo y como persona.

A mis jurados, Simone Ichiwaki y Mario Benavides por sus valiosos aportes y observaciones que contribuyeron en la realización de una investigación con excelentes resultados.

Al grupo de investigación GIBIMMA y Biotecnología Microbiana, por brindarme espacios e instrumentos para la realización exitosa de la investigación.

A los laboratoristas Maira Quiroz, Alirio Rodriguez, Vanessa Usbek y a todas aquellas personas que formaron parte en la realización de esta investigación.

A los directores de la reserva Natural Río, Mauricio Florez y Cristhian Pai por permitirnos el ingreso, exploración y toma de muestras.

A el Centro de Estudios Ambientales por la financiación de la investigación, la cual contribuyo en la relación de diferentes pruebas y procesos de difusión científica.

A el departamento de Biología por brindarme los espacios y recursos en mi formación como biólogo.

A los profesores por las enseñanzas, experiencias y conocimientos brindados.

A Luisa Zarama por acompañarme y entrar a formar parte importante en la realización de esta investigación

A mis compañeros y amigos por formar parte de momentos importantes en mi formación.

Resumen

El Departamento de Nariño, Colombia cuenta con una alta variedad de hábitats y ecosistemas escasamente estudiados que son fuente potencial para el aislamiento de bacterias productoras de metabolitos activos. El bosque húmedo presente en la Reserva Natural Río Ñambi reconocido por su alto nivel de conservación, conformó condiciones fisicoquímicas ideales para el crecimiento de 11 aislados con características semejantes a actinomicetos, de los cuales por identificación molecular 4 pertenecen a *Streptomyces*. Los aislados fueron evaluados en relación a su capacidad inhibitoria frente a bacterias patógenas resistentes *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Los datos obtenidos indican actividad antagónica del 45.45 % de los aislados frente a *E. coli* y 36.36 % frente a *S. aureus*, un promedio de 28,57 % de actividad inhibitoria observada en pozos y sensidiscos de los metabolitos de los 11 aislados en *E. coli* y 14.28 % en *S. aureus*. El metabolito de aislado p3772 presento la mayor capacidad inhibitoria de los patógenos, con actividad inhibitoria en concentraciones de 3,12 % para *S. aureus* y 0,79 % para *E. coli*. Se realizó la determinación de los componentes principales del metabolito p3772 obteniendo 12 componentes metabólicos de los cuales cuatro se encuentran relacionados a través del espectro UV con la familia de antibióticos Fenicoles de los que hace parte cloranfenicol. Los resultados obtenidos formaron el primer reporte de actinomicetos con capacidad inhibitoria para el departamento de Nariño, el primer banco de aislados y una potencial solución a la problemática de resistencia vinculada a infecciones bacterianas en la población Nariñense.

Palabras clave

Suelo, actinomicetos, metabolitos secundarios, capacidad inhibitoria, resistencia bacteriana.

Abstract

The Department of Nariño, Colombia has a high variety of sparsely studied habitats and ecosystems that are a potential source for the isolation of bacteria producing active metabolites. The wet forest present in the Rio Ñambi Nature Reserve recognized for its high level of conservation, formed physicochemical conditions ideal for the growth of 11 isolated with characteristics similar to actinomycetes, of which by identification molecular 4 belong to *Streptomyces*. The isolates were evaluated in relation to their inhibitory capacity against resistant pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

The data obtained indicate antagonistic activity of 45.45% of those isolated against *E. coli* and 36.36 % against *S. aureus*, an average of 28.57 % of inhibitory activity observed in wells and sensidisks of the metabolites of the 11 isolated in *E. coli* and 14.28 % in *S. aureus*. The isolate metabolite p3772 presented the highest inhibitory capacity of pathogens, with inhibitory activity at concentrations of 3.12 % for *S. aureus* and 0.79 % for *E. coli*. The determination of the main components of the metabolite p3772 was performed obtaining 12 metabolic components of which four are related across the UV spectrum to the fenicoles family of antibiotics of which it is a chloramphenicol. The results formed the first report of actinomycetes with inhibitory capacity for the Nariño department, the first bank of isolates and a potential solution to the problem of resistance linked to bacterial infections in the population Nariñense.

Keywords

Soil, actinomycetes, secondary metabolites, inhibitory capacity, bacterial resistance.

Tabla de contenido

| | |
|--|----|
| Resumen | 6 |
| INTRODUCCIÓN | 16 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 18 |
| JUSTIFICACIÓN | 30 |
| PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN | 32 |
| Objetivo general | 32 |
| Objetivos específicos | 32 |
| MARCO TEÓRICO..... | 34 |
| Infecciones bacterianas | 34 |
| Iniciales estudios para dar solución a las infecciones bacterianas | 34 |
| Resistencia a antibióticos de primera y segunda generación | 35 |
| Tipos de resistencia bacteriana..... | 37 |
| Mecanismos de adquisición de resistencia bacteriana | 37 |
| Productos metabólicos activos para el control de la resistencia bacteriana | 38 |
| Zonas sin exploración como fuente potencial de metabolitos | 38 |
| Agrupación taxonómica de actinomicetos | 39 |
| Incorporación de nuevos caracteres para identificación de actinomicetos | 41 |
| Condiciones ambientales en la identificación de actinomicetos | 42 |
| Clasificación de actinomicetos a través de estudios moleculares | 43 |

| | |
|---|----|
| Identificación de actinomicetos basada en la subunidad ribosomal 16S ARNr..... | 43 |
| Colombia formadora de nichos para el aislamiento de actinomicetos | 44 |
| Producción de metabolitos activos y su desarrollo | 45 |
| Injuria bacteriana estimulación para producción de metabolitos secundarios | 47 |
| Principales grupos de moléculas producidas por actinomicetos (PKS, NRPS e híbridos).. | 47 |
| Tipos de PKS..... | 48 |
| PKS TIPO I | 49 |
| PKS TIPO II..... | 49 |
| PKS TIPO III..... | 50 |
| NRPS..... | 50 |
| Híbridos NRPS/PKS | 50 |
| Antibióticos sintetizados a partir de PKS, NRPS e Híbridos..... | 51 |
| Infecciones bacterianas en el departamento de Nariño | 53 |
| ANTECEDENTES..... | 54 |
| METODOLOGÍA | 57 |
| Selección de la zona de muestreo y obtención de muestras de suelo..... | 57 |
| Transporte de muestras de suelo | 59 |
| Determinación de componentes fisicoquímicas del suelo | 60 |
| Aislamiento de Actinomicetos y Extracción de Metabolitos..... | 61 |
| Diluciones seriadas para aislamiento de actinomicetos | 61 |

| | |
|--|----|
| Perfil morfológico para identificación de actinomicetos | 61 |
| Análisis de crecimiento bacteriano | 62 |
| Conservación de aislados | 62 |
| Producción de metabolitos | 62 |
| Extracción y purificación de metabolitos secundarios | 62 |
| Inhibición y Citotoxicidad de los Aislados | 63 |
| Pruebas inhibitorias de los metabolitos | 63 |
| Prueba de antagonismo | 63 |
| Prueba de inhibición por pozos | 63 |
| Prueba de inhibición por sensidiscos | 64 |
| Prueba de concentración mínima inhibitoria (MIC) | 64 |
| Prueba de Hemólisis (citotoxicidad) | 65 |
| Identificación del Metabolito Producido por la Colonia con Mayor Potencial Inhibitorio . | 65 |
| Determinación de componentes totales del metabolito por HPLC C18 | 65 |
| Extracción y amplificación de DNA | 65 |
| Extracción de DNA Salting Out..... | 65 |
| Cuantificación de ADN..... | 66 |
| Amplificación del gen 16S rRNA | 66 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 68 |
| Colecta de muestras de suelo | 68 |

| | |
|--|-----|
| Análisis fisicoquímico de suelos | 68 |
| Aislamiento bacteriano..... | 72 |
| Curvas de crecimiento de los aislados | 76 |
| Producción y extracción de metabolitos | 78 |
| Perfil de resistencia de las bacterias Escherichia coli y Staphylococcus aureus..... | 80 |
| Pruebas de capacidad inhibitoria de los aislados | 81 |
| Antagonismo | 81 |
| Inhibición por pozos..... | 83 |
| Inhibición por sensidiscos | 84 |
| Concentración mínima inhibitoria..... | 86 |
| Prueba de hemolisis..... | 89 |
| Determinación de componentes totales por HPLC C18 | 90 |
| Extracción de DNA y PCR 16 S RNAr | 101 |
| CONCLUSIONES | 103 |
| RECOMENDACIONES | 105 |
| REFERENCIAS | 106 |

Índice de Tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Tipos de PKS. Fuente: (Hertweck., 2009, pag 18-32) | 48 |
| Tabla 2. Clasificación de antibióticos producidos por actinomicetos por familias..... | 51 |
| Tabla 3. Análisis Fisicoquímico de las Muestras de Suelo | 69 |
| Tabla 4. Pruebas Fisicoquímicas Tomadas en Campo..... | 71 |
| Tabla 5. Aislados Bacterianos con Morfología Semejante a Actinomicetos | 72 |
| Tabla 6. Características macroscópicas de los aislados. | 74 |
| Tabla 7. Perfil de Resistencia a Antibióticos de las Bacterias Patógenas | 80 |
| Tabla 8. Prueba de Antagonismo por Método en Doble Capa..... | 82 |
| Tabla 9. Prueba de Inhibición por Pozos Medido en (mm) | 83 |
| Tabla 10. Prueba de Inhibición por Sensidiscos medido en (mm)..... | 84 |
| Tabla 11. Concentración Mínima Inhibitoria de los Metabolitos Producidos por el Aislado p3772..... | 86 |
| Tabla 12. Concentración Mínima Inhibitoria de los Metabolitos Producidos por el Aislado p3772..... | 87 |
| Tabla 13. Prueba de Hemolisis..... | 89 |
| Tabla 14. Condiciones cromatograficas | 90 |
| Tabla 15. Componentes representativos en el metabolito p3772..... | 93 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. El manejo de antibióticos en procesos agrícolas como formadores de resistencia bacteriana. | 20 |
| Figura 2. La automedicación y el manejo de medicamentos extrahospitalarios como formadores de resistencia bacteriana. | 21 |
| Figura 3. Procesos de movilización humana involucrados en la diseminación y adquisición de resistencia bacteriana | 22 |
| Figura 4. El ambiente como fuente de genes para la adquisición de resistencia bacteriana. | 23 |
| Figura 5. Esquema de producción de antibióticos y la simultánea aparición de resistencia bacteriana. | 36 |
| Figura 6. Crecimiento, reproducción y fase de esporulación de actinomicetos | 41 |
| Figura 7. Policétidos PKs PNR e híbridos PK-NRP terapéuticamente relevantes..... | 51 |
| Figura 8. Ubicación geográfica de la zona de estudio..... | 58 |
| Figura 9. Protocolo de obtención de muestras de suelo (3 puntos). Fuente: esta investigación ... | 59 |
| Figura 10. Homogeneización y cuarteo de las muestras de suelo por punto. | 60 |
| Figura 11. Tinción de Gram aislados (usaron la misma magnificación para todas las imágenes?) | 74 |
| Figura 12. Curva de crecimiento de los aislados..... | 77 |
| Figura 13. Metabolitos extraídos con solvente Acetato de etilo | 79 |
| Figura 14. Cromatograma del metabolito extraído del aislado p3772. | 91 |
| Figura 15. Cromatograma metabolito del aislado p3772 Vs cloranfenicol. A. metabolito a escala normal, B. aproximación del metabolito con el antibiótico..... | 92 |

| | |
|--|-----|
| Figura 16. Cromatograma medio blanco (caldo de cultivo R5) vs metabolito del aislado p3772 | 92 |
| Figura 17. Cromatograma del metabolito p3772 con los componentes más representativos. . | 94 |
| Figura 18. Espectro UV de los componentes representativos y Cloranfenicol..... | 100 |
| Figura 19. DNA de aislados extraído con protocolo Salting Out..... | 101 |
| Figura 20. PCR 16 S RNAr de los aislados | 102 |

INTRODUCCIÓN

La presente investigación realizó la evaluación de la capacidad inhibitoria de actinomicetos *Streptomyces* aislados de suelo de la Reserva Natural Río Ñambi sobre bacterias patógenas resistentes; el estudio de los factores fisicoquímicos determinantes del crecimiento bacteriano y la formación de un banco de aislados bacterianos con caracterización morfológica y molecular.

La resistencia bacteriana problemática mundial ha conformado a través del tiempo altas tasas de mortalidad humana y ha llevado a la búsqueda de nuevos productos metabólicos, genes y biocompuestos que contrarresten estos reportes de infecciones bacterianas.

Los actinomicetos son unos de los microorganismos con mayor producción de metabolitos de interés industrial, se reporta producción de 60 a 70 % de los antibióticos actuales, dentro de estos el mayor productor es el género *Streptomyces* con antibióticos como el cloranfenicol, la estreptomicina y la eritromicina. Sin embargo antibióticos de primera y segunda generación han quedado inoperativos frente a los mecanismos de resistencia bacteriana actuales, por lo cual la ampliación de nuevas fuentes de metabolitos en zonas sin exploración, brindan una potencial solución a este creciente problema.

La investigación realizó el aislamiento del metabolito p3772 de una colonia de *Streptomyces* sp. el cual presentó 12 componentes significativos a través de una cromatografía líquida de alta resolución. Pruebas de antagonismo, inhibición por halos y concentración mínima inhibitoria, reportaron que este metabolito total presenta moléculas activas que en bajas concentraciones producen inhibición de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* vinculadas a infecciones en la población Nariñense y mundial.

Finalmente el estudio aportó con la formación del primer banco de aislados actinomicetos para el departamento de Nariño y un potencial metabolito capaz de generar inhibición en bacterias patógenas resistentes.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades producidas por microorganismos son una de las principales causas de muerte en la población humana. Los bajos controles de sanidad en los vertidos de residuos hospitalarios, el deficiente tratamiento en aguas para el consumo, la deficiente higiene en la manipulación de productos alimenticios y la exposición directa a materias fecales por sistemas de alcantarillado abiertos son la fuente principal de su desarrollo (Prevention, 2013).

Con el incremento en las tasas de mortalidad vinculadas a infecciones producidas por bacterias, hongos, virus y parásitos, la población para 1850 entró en declive por la muerte de 40 a 80 % de los enfermos (Yanez, 2011); como respuesta grupos de investigación iniciaron sus estudios con los microorganismos causantes de dichas enfermedades, el azar formó parte fundamental en las investigaciones, al descubrir microorganismos productores de metabolitos activos. Un ejemplo conocido es el del investigador Alexander Fleming quien para ese momento trabajaba con cepas de *Staphylococcus* y observó la inhibición producida por una cepa del género *Penicillium* la cual ingresó a sus medios de cultivo accidentalmente, de este hongo posteriormente se aisló el antibiótico conocido como Penicilina. Fleming en 1945 mencionó que la aplicación de una dosis insuficiente de antibiótico, pueda generar resistencia en las bacterias (Villalobo Polo, 2019).

El descubrimiento del primer antibiótico generó un auge en la búsqueda de nuevos compuestos que reduciría las altas tasas de mortalidad e incrementaría la esperanza de vida en la población de los años cuarenta (Lozano, 2012); de igual forma generó la base para la realización experimental de diversos tratamientos de alto riesgo por su recurrencia en contaminación bacteriana (Pagalilauan GL, 2013).

Durante las últimas décadas se ha observado como antibióticos de primera y segunda generación han perdido su funcionalidad, estos procesos de adquisición de resistencia se han agrupado cuatro:

- I. Manejo de antibióticos en altas proporciones en ganadería y agricultura
- II. El manejo de antibióticos de forma extrahospitalaria
- III. Procesos de movilidad humana y adaptación bacteriana
- IV. El ambiente como fuente de genes de resistencia.

La primera causa expuesta como la originaria de la mayoría de los reportes de resistencia bacteriana se centra en la sobre formulación innecesaria de antibióticos en las fuentes primarias de la alimentación humana, principalmente con la suplementación de tetraciclinas y aminoglucósidos que desempeñan la función de agentes promotores de crecimiento (Arenas, 2018; Cabello., 2006). Para el año 2013 en Estados Unidos, Australia y China se estimó que la producción de antibióticos para uso en animales fue mayor o superior al producido para humanos y como resultado se encuentran los efectos secundarios que involucran la adquisición de resistencia bacteriana y su transmisión a humanos a través de los alimentos (Figura 1.) (Pruden A, 2013).

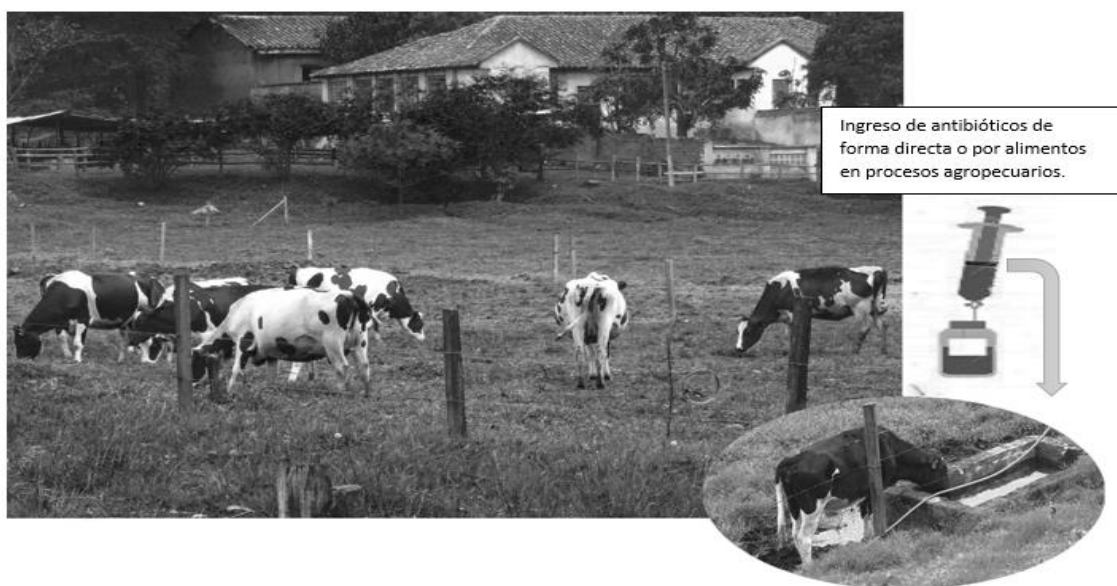


Figura 1. El manejo de antibióticos en procesos agrícolas como formadores de resistencia bacteriana.

Fuente: Esta investigación.

La segunda causa de resistencia bacteriana es el entorno clínico por ser el epicentro donde los microorganismos patógenos entran en contacto con diferentes especies bajo la presión de antibióticos, se obtiene el mayor número de aislados resistentes y de mayor registro epidemiológico asociados a infecciones causados principalmente por bacterias. Los primeros reportes solo incluyen bacterias Multiresistentes (hasta dos antibióticos), el siguiente rango de tolerancia a antibióticos se denomina Extremadamente resistentes (hasta tres antibióticos) o Panresistentes que superan los tres antibióticos, pueden llegar a ser casos críticos por ser bacterias que aún no presentan tratamiento farmacológico (Mensa, 2018).

La autoformulación de antibióticos de forma extra hospitalaria promovió el aumento en la resistencia bacteriana, cuyos métodos de control en algunos eventos son intratables con los regímenes farmacológicos actuales. La Organización mundial de la Salud (OMS) soporta a la automedicación como una de las principales causas promotoras de resistencia por abarcar su práctica en cerca de 80 % de la población mundial y por ser alarmante su predominancia en países Tercermundistas (Figura 2) (OMS, 2017).

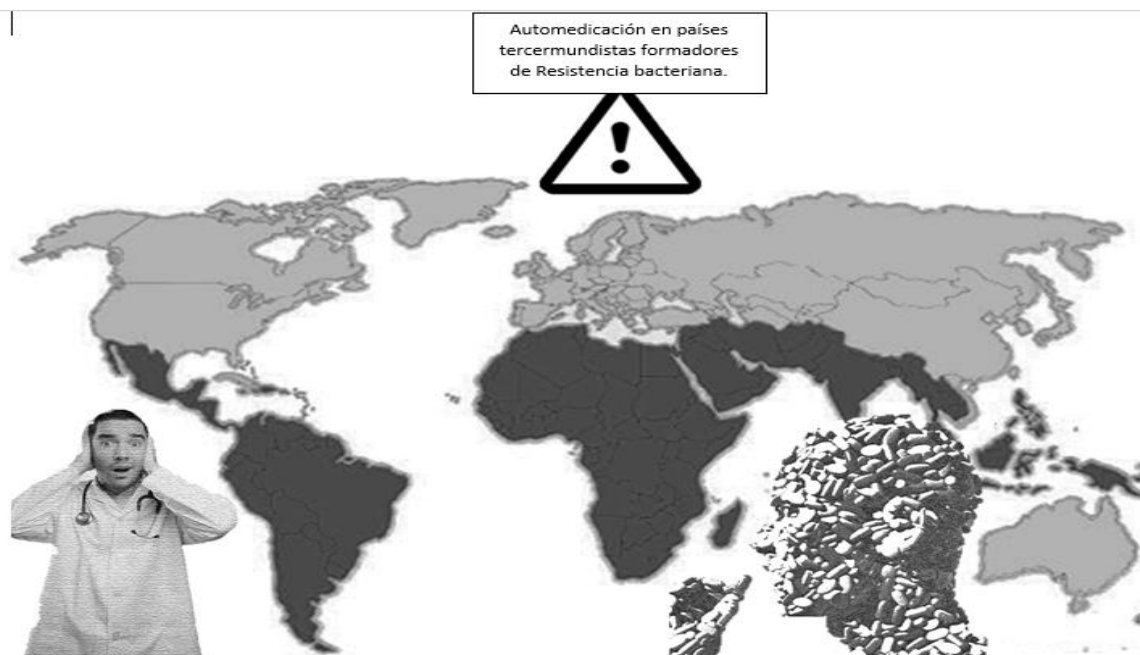


Figura 2. La automedicación y el manejo de medicamentos extrahospitalarios como formadores de resistencia bacteriana.

Fuente: esta investigación

La tercera causa involucra la movilización humana, sus mecanismos asociados y la rápida adaptación bacteriana. Las modernas rutas de comercio y el alto tráfico aéreo existente son medios que brindan los mecanismos adecuados para la diseminación de genes y bacterias causantes de enfermedades. El efecto de dispersión y contagio entre humanos y entre humanos y animales se presenta regularmente, evidenciado en los brotes de enfermedades simultáneas en zonas significativamente alejadas, pero producidos por las mismas cepas bacterianas (Saxena, 2018; Griffin, 2007; Llambías Wolff, 2003). Un factor crítico asociado a la movilización humana es el transporte involuntario de bacterias con alto potencial de generación de enfermedades, dicho potencial no es expresado a plenitud por ser “controlado” por una serie de presiones externas ambientales (temperatura, humedad, pH, fuente de materia orgánica entre otros). Sin embargo, con la movilización el nuevo medio puede carecer de ciertas presiones y brindar los mecanismos

ideales para un rápido crecimiento y dispersión (Figura 3.) (Galán Montemayor, 2014; Calderón Murillo, 2012).



Figura 3. Procesos de movilización humana involucrados en la diseminación y adquisición de resistencia bacteriana

Fuente: esta investigación

Finalmente la última causa y la que forma una fuente principal y potencial de genes de resistencia es el ambiente, los diferentes procesos ecológico-evolutivos han brindado diferentes mecanismos para la adquisición de material genético externo como los plásmidos, transposones e integrones, entre otros, donde el ambiente cambiante generó las condiciones ideales para la distribución de dichos genes de forma ilimitada, desempeñando un papel facilitador y diseminador de dichos factores (Figura 4) (Baquero F, 2015).

Por otra parte, la recombinación, las mutaciones y las transferencia horizontal y vertical de genes contribuyen al aumento en la variabilidad genética y la generación de un proceso de cambio genético con potencial en la formación en bajas tasas de resistencia bacteriana y la posible

explicación de bacterias ambientales tolerantes a antibióticos (Marston, 2016; Andersson, 2016; Levin-Reisman, 2017)



Figura 4. El ambiente como fuente de genes para la adquisición de resistencia bacteriana.

Los mecanismos de resistencia microbiana que incluyen la interacción de los compuestos bioactivos y sus elementos, aún no han sido descritos en su totalidad. Esto debido a la respuesta variable de las bacterias al tratamiento aplicado. Factores como la expresión bioquímica, metabólica o genética son determinantes en la inoperatividad de los antibióticos de primera y segunda generación y como consecuencia se presenta una reducción significativa de la efectividad de los antibióticos usados en la actualidad y establecen un factor de aceleración en los procesos epidemiológicos asociados a infecciones bacterianas, además de su contribución en el desarrollo de enfermedades crónicas (Tacconelli, 2018; Bengtsson-Palme, 2016).

En las últimas décadas la biotecnología ha centrado parte de sus estudios en nuevos tratamientos basados en rutas metabólicas, genes y compuestos químicos con potencial regulador e inhibidor de infecciones o enfermedades producidas por patógenos. Una de las soluciones desarrolladas en

generaciones anteriores y fuente potencial de compuestos bioactivos en la actualidad son los microorganismos (Najafpour, 2007), por su elevada producción de compuestos bioactivos, formados en su mayoría en procesos metabólicos secundarios (Evangelista-Martínez, 2007).

Los compuestos obtenidos de metabolitos bacterianos poseen una amplia gama de aplicaciones industriales representadas en empresas de alimentos, medicamentos, textiles, cosméticos, entre otras. Sin embargo, se estima que el total potencial existente para la producción de compuestos bacterianos activos es conformado por una mínima parte, asociado principalmente a exigencias específicas para el aislamiento bacteriano, dichos requerimientos se centran en condiciones nutricionales y ambientales ideales, dificultando el aislamiento de potenciales colonias bacterianas; se indica la existencia de millones de microorganismos aún no descubiertos o no aislados que pueden ser promisorios en la producción de compuestos bioactivos de interés (Egas Rosero, 2016).

La búsqueda de microorganismos en nichos sin explotación humana ha brindado una amplia diversidad de especies bacterianas con potenciales productos metabólicos. Investigaciones realizadas por Kumari y colaboradores (2017); Nafis y colaboradores (2017) y Ganesan y colaboradores en 2017, demuestran como la exploración de nuevos nichos ecológicos, con niveles bajos de intervención humana (carentes de vías de movilización, edificaciones y extracción de materias primas) presentan condiciones específicas que son limitantes en el crecimiento y desarrollo de diversos microorganismos con potencial en la producción de metabolitos activos.

Las principales áreas de investigación y aislamiento bacteriano se concentran en nichos terrestres y marinos, por contar con una compleja red de interacciones físicas y químicas, determinantes en la formación de una amplia gama de elementos, nutrientes y condiciones ambientales específicas para el crecimiento bacteriano (Agadagba, 2014; Patiño, 2007).

Colombia con su sistema tropical cuenta con una amplia variedad de climas producto de su variación altitudinal montañosa y sus costas limitantes con el océano Atlántico y Pacífico, formando una amplia composición de nichos, hábitats y microhábitats ideales para el desarrollo de diversas formas de vida. Uno de los departamentos ubicado al suroccidente del país es Nariño, sobre una de sus cordilleras se establece un bosque pluvial reconocido por elevado nivel de conservación producto de la formación de un sistema de protección de fauna y flora llamado Reserva Natural Río Ñambi.

La reserva cuenta con características ambientales únicas para el desarrollo de una amplia variedad de microorganismos; específicamente presenta tasas de precipitación anual de 8000 mm que confiere índices de humedad altos y constantes, además de presentar una temperatura promedio de 19 °C, estas condiciones ambientales han establecido tasas de degradación bajas, generando una alta retención de materia orgánica en el suelo, fuente de alimento y elementos para la formación de compuestos activos posteriores a su metabolización (Codazzi, 2001).

La alta disposición de materia orgánica en zonas conservadas es determinante de la riqueza y abundancia de los microorganismos presentes, se estima que estos índices incrementan con el tiempo, haciendo referencia al grado de recuperación y sucesión de materia orgánica e inorgánica en un ecosistema. Sivila y colaboradores en 2006 reportaron como la recuperación del suelo con explotación agrícola, contribuyó al incremento gradual en el número de microorganismos más representativos en el suelo como son bacterias, actinomicetos, hongos, acidófilos y esporulados.

De estos el microorganismo con mayor representación son los actinomicetos; que son bacterias Gram positivas, filamentosas, esporuladas y con crecimiento micelial, conforman aproximadamente el 30 % del total de microorganismos aislados de suelo, este porcentaje puede variar en dependencia al nivel de intervención antropogénica o a las condiciones ácido-básicas del

suelo; el estudio realizado por Cardona y colaboradores en 2009, comprueba cómo la vegetación en Bosque, Pastizal y Rastrojo modifica la materia orgánica en el suelo y el número de actinomicetos presentes, obteniendo un aumento en la abundancia, a medida que el estado de conservación incrementó, pasando de 0.29×10^4 actinomicetos en pastizal a 0.79×10^4 en Bosque. Este elevado número de aislados, es explicado por el amplio número de sustratos utilizados por los actinomicetos.

Por ser en su mayoría saprófitos, los actinomicetos están vinculados en procesos de mineralización y fertilización del suelo, esta degradación y metabolización de compuestos los ha conformado como uno de los mayores productores de metabolitos secundarios activos y uno de los principales productores de antibióticos a nivel mundial con aproximadamente 60 % de los antibióticos actuales (Cornell, 2018).

En actinomicetos la activación del metabolismo secundario para obtención de metabolitos de interés se ha realizado a través del tiempo con diferentes mecanismos y herramientas, el método con mayor aplicación biotecnológica para la estimulación del metabolismo secundario es la injuria bacteriana, que es la inducción de condiciones estresantes provocadas por la variación de las estándares óptimos de crecimiento bacteriano, por ejemplo la modificación en la temperatura, pH, humedad, suministro o eliminación de la fuente principal de carbono y el ingreso de sustancias tóxicas, estimulantes o ajenas al medio de crecimiento (Chaudhary, 2013).

De los 33 géneros de actinomicetos registrados, los géneros *Streptomyces*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora* y *Saccharopolyspora* son los que mayor producción de biocompuestos reportan actualmente; los principales productos extraídos se han aplicado en la elaboración de antibióticos, antifúngicos, antitumorales, inmunosupresores y enzimas (Chaudhary, 2013). Los antibióticos eritromicina, estreptomycin y cloranfenicol son unos de los compuestos con mayor uso

farmacológico, destacándose por su acción bactericida o bacteriostática de microorganismos patógenos como *Streptococcus sp*, *Legionella pneumophila*, *Campylobacter jejuni*, *Brucella sp.* y *Yersinia sp.* entre otros (Pandey, 2011). Sin embargo, los manejos inadecuados de estos antibióticos igualmente fueron causantes de la adquisición de resistencia bacteriana por microorganismos como *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Enterococcus intestinalis*, *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium sp*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, los dos últimos patógenos catalogados dentro de la lista de prioridad crítica por parte de la OMS (2017), por ser productores de una amplia variedad de infecciones entre las que se resalta las de tipo urinario.

Los reportes de infecciones bacteriana en la comunidad son elevados y con altas tasas de recurrencia, cerca de 40% de los casos epidemiológicos son producidos en mujeres y 12% atribuidos a hombres (Foxman, 2002); el registro de los aislados bacterianos causantes de dichas infecciones son escasos, sin embargo, los antecedentes indican que el patógeno *Escherichia coli* es responsable de 70 a 95% de las infecciones bacterianas (Sivick KE M. H., 2010) y *Staphylococcus aureus* patógeno prevalente en infecciones en la población perteneciente a la tercera edad o inmunocomprometida en 35% (Cruz, 2018).

Actualmente en el departamento de Nariño, las investigaciones involucradas con patógenos resistentes asociados a infecciones bacterianas están iniciando, el primer trabajo de maestría que evalúa los procesos de adquisición de resistencia bacteriana en *Escherichia coli* está en ejecución, e indica la problemática de la población Nariñense con el incremento de infecciones bacterianas y como sus mecanismos de transmisión de genes pueden ser causantes de altas tasas de mortalidad humana (Guerrero, 2019). Con base en lo expuesto, la búsqueda metabolitos producidos por Actinomicetos aislados de zonas sin exploración puede generar una potencial sustitución de los

antibióticos de primera y segunda generación que han quedado inoperativos con la resistencia bacteriana y brindar una potencial solución a la población Nariñense con prevalencia de infecciones bacterianas producidas por *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

JUSTIFICACIÓN

Colombia, y en especial el departamento de Nariño cuentan con alta variación en su relieve, generados por diferentes accidentes geográficos, los cuales se encuentran vinculados a las cordilleras occidental y central, formando una cadena de montañas que brindan variedad climática específica por zona, y que junto a la zona intertropical, forman una red de condiciones ambientales idóneas para el crecimiento de diferentes microorganismos (Arango, 2015).

Con los anteriores planteamientos, la investigación evaluará la capacidad inhibitoria de metabolitos producidos por actinomicetos aislados del bosque húmedo de la reserva natural Rio Ñambi del corregimiento de Altaquer - Barbacoas, zona que cuenta con factores ambientales físico-químicos idóneos para el desarrollo y crecimiento de actinomicetos, y que además presenta un alto grado de conservación, incrementando el porcentaje para su obtención y aislamiento.

La elección de los actinomicetos como base de estudio, se encuentra fundamentada en referencias y en investigaciones como la de Parada, R. & Vallejo, M. en 2017, que indican un alto porcentaje de producción de metabolitos activos para uso farmacéutico con un valor aproximado de 63 %, y una producción de compuestos con diversos usos industriales de 62 % (Chaudhary, 2013).

Posterior al aislamiento de los actinomicetos, se propone analizar el potencial de inhibición de los metabolitos en microorganismos patógenos *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* causantes de infecciones en la población Nariñense.

La selección de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* como organismos de prueba, se basó en la lista de prioridad crítica emitida por la OMS, que indica la amenaza potencial de estas

bacterias sobre la supervivencia humana (OMS, 2017; Tacconelli, 2018); y por ser bacterias con alta recurrencia en casos clínicos de infección bacteriana en Nariño.

La selección del departamento de Nariño y de la Reserva Natural Río Ñambi como zona de muestreo, se basó en el alto grado de conservación de la reserva y en las condiciones físico químicas como el pH, humedad, temperatura y disponibilidad de materia orgánica ideales para el crecimiento y desarrollo de Actinomicetos, además de ser el primer reporte de actinomicetos utilizado en el área de la salud con potencial en el control o inhibición de bacterias patógenas productoras de enfermedades infecciosas, reportadas a nivel epidemiológico en el Departamento de Nariño.

Finalmente, el trabajo busca ampliar la base de datos que reportan actinomicetos productores de metabolitos con potencial actividad antimicrobiana sobre bacterias resistentes para Colombia, en especial para el departamento de Nariño, la creación de un banco de aislados de suelo de bosque húmedo y la identificación de la cepa con mayor potencial en el control de las bacterias patógenas resistentes (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*), foco de este estudio.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la capacidad inhibitoria de actinomicetos aislados de bosque húmedo del departamento de Nariño sobre las bacterias patógenas resistentes a antibióticos (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*)?

Objetivo general

Evaluar la actividad inhibitoria de actinomicetos aislados de bosque húmedo de la reserva natural Río Ñambi, del corregimiento de Altaquer - Barbacoas, sobre el crecimiento de bacterias patógenas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos, aisladas de muestras clínicas.

Objetivos específicos

- Indicar los factores físico-químicos con mayor relevancia del suelo de la zona de muestreo, determinantes del crecimiento de actinomicetos.
- Obtener un banco de aislados actinomicetos a partir de muestras de suelo extraídas en bosque húmedo del departamento de Nariño.
- Caracterizar a nivel morfológico y molecular los aislados.

- Determinar la actividad inhibitoria de los metabolitos producidos por los actinomicetos aislados, sobre el crecimiento de bacterias patógenas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos.

MARCO TEÓRICO

Infecciones bacterianas

Las infecciones producidas por microorganismos son una de las principales causas de mortalidad humana. Los bajos controles de salubridad en fuentes de agua, alimento fresco, desechos y el deficiente sistema de alcantarillado generaron en diferentes oportunidades el crecimiento descontrolado de bacterias, hongos, virus y parásitos productores o mediadores de múltiples pandemias (Yanez, 2011). El grado de mortalidad por infección bacteriana se estima que incrementa en 8 % por cada hora que no se aplicó un tratamiento de antibióticos y es mayor el incremento cuando se realiza la formulación indiscriminada de antibióticos, llegando a 50 % los casos de mortalidad (R. Ferrer, 2014; S. Fridkin, 2014).

Iniciales estudios para dar solución a las infecciones bacterianas

A principios del siglo XX diferentes variantes de *Staphylococcus* fueron responsables de la muerte de millones de vidas humanas. El investigador Alexander Fleming había realizado aislamiento de dichas cepas patógenas y accidentalmente observó como una colonia del Género *Penicillium* realizaba inhibición del crecimiento de estas variantes y mencionó por primera vez al compuesto producido como un posible tratamiento para infecciones bacterianas y advirtió que el uso de concentraciones inadecuadas podrían originar la resistencia de los microorganismos blanco (Villalobo Polo, 2019).

Posteriormente, en 1943 los investigadores Selman A. Waksman y Albert Schatz formadores de los primeros protocolos de extracción de metabolitos, observaron cómo actinomicetos bacterias

filamentosas esporuladas formaban una amplia variedad de metabolitos activos, durante este año Schatz realizaría el aislamiento de *Streptomyces griseus* y observaría como este aislado produciría un compuesto capaz de inhibir tanto a bacterias Gram positiva y Gram negativas a diferencia de la Penicilina y además observaría inhibición sobre el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*, bacteria productora de tuberculosis, problemática de importancia epidemiológica del momento (Palmero, 2016).

Los metabolitos aislados formaron una inicial solución a las infecciones bacterianas. Sin embargo, antecedentes sobre la eficiencia de los tratamientos antimicrobianos empezaron a disminuir pocos años después y el aislamiento de bacterias resistentes se presentó con mayor frecuencia llegando a superar el tiempo de generación de un nuevo compuesto (Alós, 2015).

Resistencia a antibióticos de primera y segunda generación

El ingreso de los antibióticos en el siglo XX, además de salvar millones de vidas, formaría la base para la realización de un mayor número de estudios médicos, quirúrgicos y tratamientos quimioterápicos para individuos inmunosuprimidos o con enfermedades crónicas, los cuales presentaban prevalencia de infecciones bacterianas (CL., 2015). No obstante, en poco tiempo se observó cómo aislados no presentaban acción inhibitoria significativa frente a los antibióticos, inicialmente se atribuyó este efecto a procesos naturales, pero posteriormente el uso incorrecto e indiscriminado de antibióticos en humanos, animales y plantas llevaría a un estado crítico su efecto inhibitorio (Mohr, 2016; Bengtsson-Palme J. K., 2017).

Ovejero en su tesis doctoral de 2017 indica como la producción de antibióticos era proporcional con la adquisición de resistencia bacteria (Ovejero, 2017). Para el momento la tasa de hallazgo y producción de antibióticos era menor a la tasa de aparición de resistencia bacteriana llevando nuevamente a un punto crítico el tratamiento de infecciones bacterianas (Figura 5).

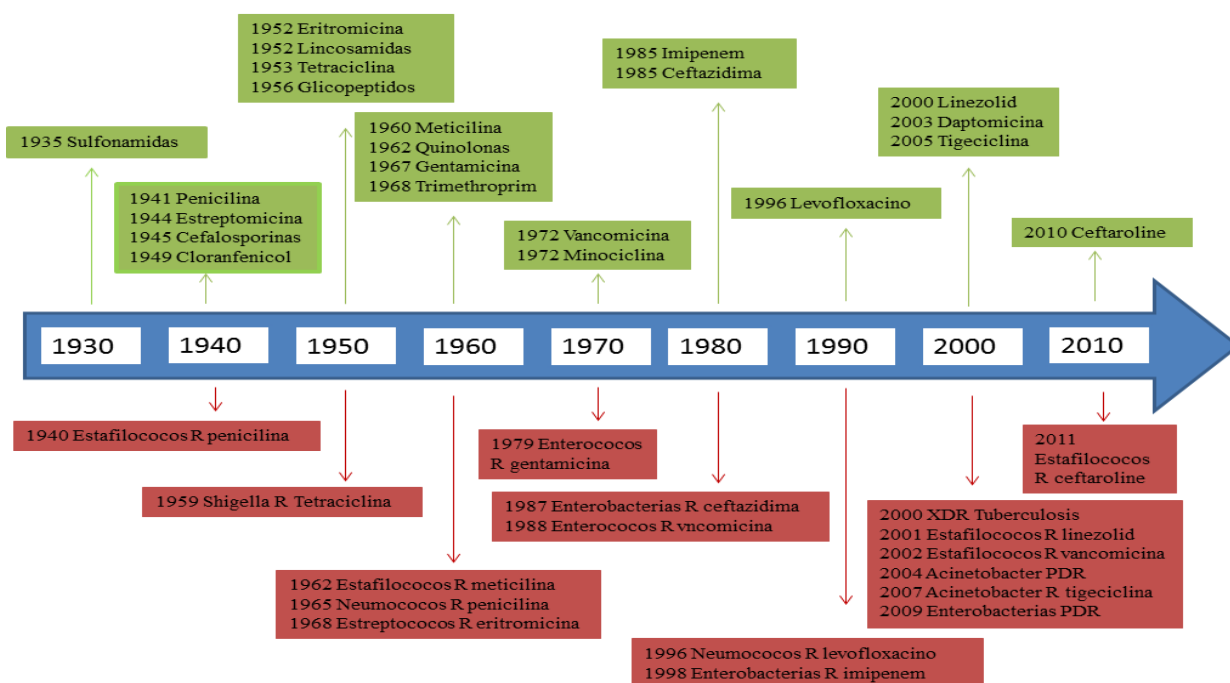


Figura 5. Esquema de producción de antibióticos y la simultánea aparición de resistencia bacteriana.

Fuente: (Ovejero, 2017, pag 31).

La resistencia bacteriana nuevamente formaría punto de partida para nuevas investigaciones en busca de potenciales metabolitos capaces de sustituir los que quedaron inoperativos y formaría la base para el estudio de los diversos mecanismos utilizados por bacterias para la adquisición de resistencia y que puede ser crucial para su control.

Tipos de resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana se la incorporó en dos grupos: resistencia natural o intrínseca y la resistencia adquirida. La resistencia natural es específica e inherente en algunas bacterias, su surgimiento es previo a la aparición de los antibióticos, y son base para la administración adecuada de tratamientos. Por otra parte, la resistencia adquirida se fundamenta en la reconfiguración, modificación o cambio de algunas secuencias génicas en las bacterias, estos procesos pueden ser temporales (mediados por la presión del entorno) o permanentes fijados a través de mecanismos como mutaciones, plásmidos, transposones o integrones generalmente. Este tipo de resistencia forma un problema crítico por ser un proceso constante en el tiempo y el principal factor de resistencia bacteriana (Abreu O, 2011; Fernández F, 2003).

Mecanismos de adquisición de resistencia bacteriana

Las primeras explicaciones no naturales al surgimiento de la resistencia bacteriana se fundamentaron en series de mutaciones aleatorias de las cuales la probabilidad de obtención de resistencia era baja. Posteriormente los mecanismos de transferencia de genes formaron parte de las teorías con mayor aceptación actualmente, sustentadas en mecanismos de transmisión horizontal, vertical y los elementos genéticos móviles como transposones, integrones y plásmidos (CL., 2015).

La resistencia bacteriana comprende cinco mecanismos principales (Elliot, 1999). El primero formado por un sistema de bombas expulsoras de los antibióticos o tóxicos (Moreno C, 2009), el segundo con la disminución de la permeabilidad de la pared bacteriana por modificaciones en

tamaño o número de porinas (Cordiés L, 1998), el tercero con la producción de enzimas hidrolíticas, degradadoras o inactivadoras de antibióticos (Cabrera C, 2007), el cuarto mediado por la modificación proteica de los sitios específicos o diana, evitando el reconocimiento, acople o afinidad del antibiótico al sitio blanco (Moreno C, 2009) y el quinto asociado a la formación de biofilms protegiendo a la bacteria de la radiación UV, la deshidratación, la acción de antibióticos, el ambiente y otros microorganismos (Abreu O, 2011).

Productos metabólicos activos para el control de la resistencia bacteriana

El estudio de rutas metabólicas, genes y compuesto activos con potenciales reguladores o inhibitorios (bacteriostático o bactericida) de infecciones producidas por bacterias resistentes se ha realizado durante décadas a partir de microorganismos (Najafpour, 2007), por tener una elevada producción de metabolitos activos, formados en su mayoría en procesos metabólicos secundarios (Evangelista-Martínez, 2007).

La búsqueda de estos metabolitos bacterianos ha disminuido en la actualidad, producto de los requerimientos específicos de algunas bacterias para su aislamiento, los costos de producción, extracción y purificación de metabolitos y la demanda de antimicrobianos en el mercado actual. Sin embargo, se estima la existencia de millones de microorganismos y metabolitos con actividad funcional aún no descubiertos en zonas sin exploración, con alto potencial para el control de patógenos y una posible solución a la resistencia bacteriana existente en antibióticos tradicionales (Egas Rosero, 2016).

Zonas sin exploración como fuente potencial de metabolitos

La abundancia y diversidad de microorganismos presentes en un ecosistema es regulado por diferentes interacciones fisicoquímicas que juegan un papel importante en la metabolización de

compuestos activos. La mayor exploración de microorganismos productores de estos compuestos se ha realizado sobre nichos terrestres (suelos) y marinos (sedimentos), sin embargo, la obtención de nuevos aislados se ha reducido en las dos últimas, por la exploración constante de las mismas zonas y la intervención antropogénica de estos ecosistemas (Cardona G. I., 2005; Durrer, 2017)

La exploración de nuevos nichos, con niveles bajos de intervención y altos niveles de conservación está en auge actualmente, el desconocimiento existente de los procesos microbianos, su composición y riqueza pueden ser fuente potencial de aislados y moléculas con actividad antimicrobiana (Kumari, 2017; Nafis, 2017; Ganesan, 2017; Agadagba, 2014). La alta concentración de materia orgánica en el suelo en zonas conservadas o con descanso agrícola es determinante de la diversidad bacteriana, contribuyendo con el desarrollo de los organismos más representativos (Sivila de Cary, 2006).

Uno de los microorganismos con mayor representación en el suelo son los actinomicetos, microorganismos en su mayoría saprófitos relacionados con procesos de mineralización y fertilización, dependientes de la cantidad de materia orgánica y las condiciones ácido básicas del suelo (Parada, 2017).

Agrupación taxonómica de actinomicetos

Los actinomicetos bacterias Gram positivas fueron durante 40 años (1950-1990) tema de especulación por presentar estructuras filamentosas, esporuladas y miceliares similares a hongos, por esto fue denominado en el momento un grupo especial. Con nuevos estudios sobre el grupo y la incorporación de nuevas tecnologías, se reconoció como un grupo totalmente independiente,

con ausencia de membrana nuclear, micelio no superior a 5 μm y reproducción por esporas (Figura 6) (Bonifaz Trujillo, 2012).

La incorporación de sistemas de clasificación morfológicos, ecológicos y fisiológicos formaron las bases para nuevas agrupaciones, sustentadas en atributos como la pigmentación, ocurrencia en la naturaleza, crecimiento aeróbico, acción enzimática (proteolítica) y conformación de la colonia (morfoloía macroscópica). Sin embargo, estas agrupaciones continuaban aún con alta variación entre grupos. Posteriormente, la clasificación de actinomicetos que buscaba plantear la asociación de los órdenes, familias y géneros, se fundamentó en diferentes procesos como la formación de nódulos, el tamaño de la colonia, la exigencia de oxígeno (aerobia y anaerobia), la conformación del micelio presencia y ausencia (micelio aéreo) y el tipo de espora, todos estos atributos justificaban la gran variabilidad y transición de los actinomicetos, pero no podían ser aplicados para especies, sino para grupos de especies (Uzcátegui-Negrón, 2009; Arifuzzaman, 2010).

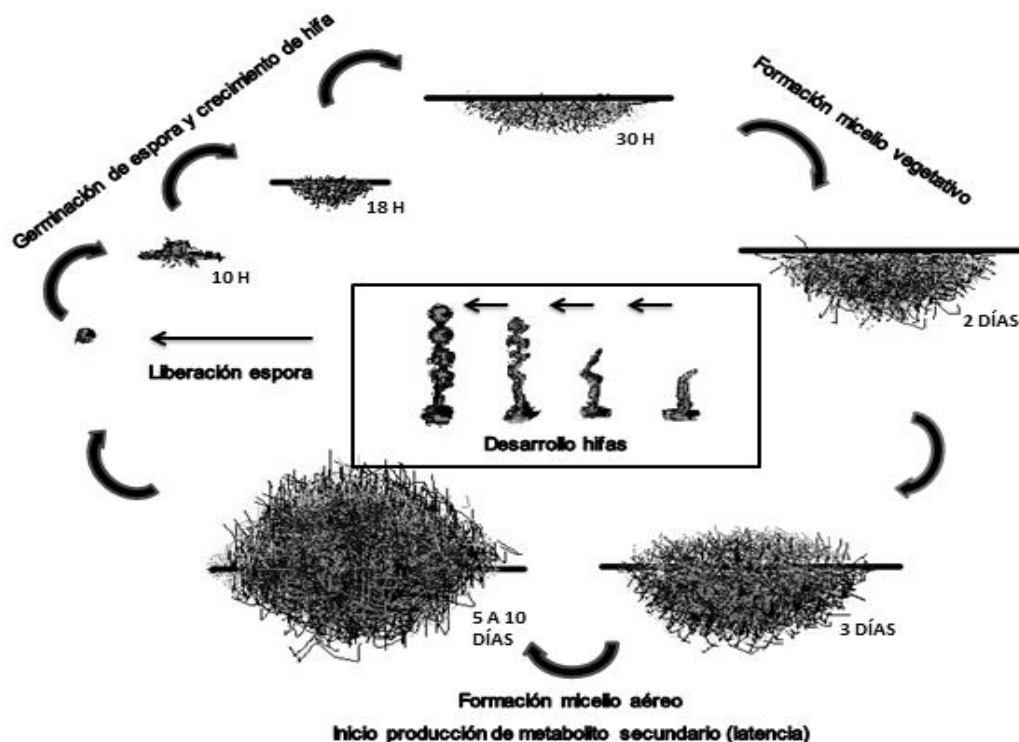


Figura 6 Crecimiento, reproducción y fase de esporulación de actinomicetos

Fuente: esta investigación

Incorporación de nuevos caracteres para identificación de actinomicetos

Caracterizaciones detalladas ingresaron a formar parte de nuevas agrupaciones como:

- La forma del micelio unicelular: bifurcado, rosca y varilla.
- Los tipos de micelio: vegetativo unido al sustrato y aéreo presente en algunos, relacionado con el esparcimiento de esporas.
- Los grupos de esporofitos: de forma solitaria (monopodial) o en agrupaciones.
- Las agrupaciones de esporas: de forma ramificada, sin ramificación o dispersas individualmente.
- El tipo formación de esporas: por fragmentación del plasma del micelio aéreo o por la división del micelio en las células reproductoras.

- La morfología de las esporas: cilíndricas, ovales y esféricas.

Estos caracteres, generaron una mayor relación entre unos grupos y diferenciación entre otros, pero de igual forma no formaban bases sólidas para dichas agrupaciones (Waksman, 1940).

Caracteres de coloración presentados en la madurez del micelio, fueron ampliamente trabajados, especialmente sobre el micelio aéreo, por generar una amplia gama de colores (gris, verde, violeta, azul y blanco) que varían en dependencia al medio utilizado y el metabolito producido. Algunos aislados poseen variación en la cara dorsal y ventral, formando dos coloraciones. En la mayoría de los actinomicetos se presenta variación en la coloración de la margen de la colonia, producido por el tiempo de vida de las células. Otro carácter importante son las hifas que no superan los 5 μm de diámetro, los esporóforos y la presencia o ausencia de cadenas de esporas (Sharma, 2014; Muthu, 2013).

Condiciones ambientales en la identificación de actinomicetos

Los actinomicetos en su mayoría son saprófitos, degradan una amplia gama de sustratos complejos como celulosa, hemicelulosa, lignina, parafina y quitina, siendo importantes en el proceso de transformación de la materia (mineralización), algunos son parásitos oportunistas de plantas y animales, y una pequeña parte como el género *Frankia* realizan simbiosis con plantas (Tuomela, 2000; Ramírez, 2003; García, 2011). La mayoría de actinomicetos se ubican en zonas poco profundas de suelos o sedimentos marinos, captando mayor concentración de oxígeno y materia orgánica en el medio (Gebreyohannes, 2013).

Una condición importante para la identificación de actinomicetos es la fuente de carbono, la preferencia por el tipo de azúcar presente en el medio ha sido determinante en la selección de

géneros de actinomicetos (*Actinomyces*, *Nocardia* y *Streptomyces*) productores de metabolitos activos (Silini, 2016).

El pH es uno de los factores con mayor prioridad y el más influyente en la presencia de actinomicetos en un ecosistema, relacionado con la fuente de materia orgánica disponible en el medio (suelo). La mayoría de los actinomicetos se desarrollan favorablemente en pH alcalino-neutro, carácter preferencial derivado de la composición de su membrana celular. Algunos actinomicetos han modificado la permeabilidad de la membrana, permitiendo tolerar condiciones ácidas moderadas (Ghorbani-Nasrabadi, 2013).

Clasificación de actinomicetos a través de estudios moleculares

Los estudios moleculares basados en secuencias de ADN y ARN de regiones conservadas, han conformado las agrupaciones de actinomicetos existentes (Paul, 2014). La composición genética de actinomicetos es conformada en su mayoría por guanina citosina (G-C) con valores de 63 a 75 %, estructurando una alta estabilidad en su genoma (Jiménez, 2010). Del total de su genoma 6 y 10 % se encuentra involucrado con la producción de metabolitos secundarios, en su mayoría de naturaleza proteica como: antibióticos, antitumorales, inmunosupresores, antibacterianos, antifúngicos, antioxidantes, neurogénicos, anticancerígenos, antiinflamatorios y enzimas (Doroghazi, 2013).

Identificación de actinomicetos basada en la subunidad ribosomal 16S ARNr

Los estudios moleculares filogenéticos con mayor relevancia se encuentran basados en secuencias conservadas. Uno de los genes evaluados es 16s ARNr por establecer relaciones

filogenéticas, mecanismos de evolución y base para la identificación bacteriana (Ong, S. H. et al., 2013). En actinomicetos se han realizado pruebas para la caracterización de especies, guiadas con cebadores universales o específicos a las secuencias del gen 16s ARNr (Sharma, 2014).

Colombia formadora de nichos para el aislamiento de actinomicetos

Colombia cuenta con una alta diversidad de condiciones ambientales, que determinan la composición de diferentes elementos biofísicos interactuantes. Elementos como el clima, el relieve, la geología, que unidos a la fauna y flora determinan una red de interacciones propicias para el crecimiento de diversos microorganismos como los actinomicetos. En Colombia se considera a nivel general que las características del suelo se encuentran vinculadas a las regiones geográficas del país, así para la región Andina catalogada como mega-diversa, por presentar variaciones altitudinales que terminan la formación de diversos nichos y a su vez la composición del suelo y microorganismos (Malagón, 1995; Codazzi, 2001).

Investigaciones realizadas en nichos colombianos, han encontrado características especiales para el desarrollo y aislamiento de actinomicetos con metabolitos activos. Una investigación destacada es la realizada por Rueda C. y colaboradores en 2009, donde se aislaron actinomicetos del Humedal la Conejera, ambiente con alta intervención por residuos hospitalarios y desechos mineros. Esta investigación evaluó el alto potencial detoxificador de los aislados frente al mercurio (Rueda C., 2009).

La investigación realizada en Colombia por Cardona y colaboradores (2009), observó como las comunidades de actinomicetos variaban en cobertura, profundidad y abundancia en dependencia a la vegetación presente (Bosque, pastizal y rastrojo), concluyendo que los valores incrementaron

con el aumento de la vegetación (fuente de materia orgánica). De igual manera Fonseca y colaboradores en 2011, evaluaron procesos simbióticos de actinomicetos con la planta *Bidens pilosa* L., aislando 8 colonias cuyos metabolitos presentaban actividad antagónica frente a *Phytophthora infestans*, microorganismo patógeno.

Producción de metabolitos activos y su desarrollo

La variación en los componentes activos producidos por actinomicetos puede originarse dentro del mismo género o hasta incluso dentro de la misma especie, se conoce que algunos actinomicetos pueden generar diferentes metabolitos durante su etapa de latencia. Por esto, la importancia del estudio molecular vinculado a la producción de metabolitos ha conformado las base para su estudio biotecnológico (Waksman, 1940).

La necesidad de nuevos fármacos y antibióticos que formen frente a las infecciones bacterianas generó un crecimiento acelerado de la industria farmacéutica (Pereira, 2018), reportando después de seis décadas, el descubrimiento de 8000 antibióticos, de los cuales 62 % eran producidos por actinomicetos y 38 % por bacterias y hongos (Evangelista-Martínez, 2007). El alto porcentaje conformado por actinomicetos se encuentra soportado por la alta selectividad del mecanismo de acción de los antibióticos, resaltando la inhibición de la síntesis de la pared celular, síntesis proteica, síntesis de ácidos nucleicos, funcionamiento deficiente de la membrana celular y en algunos daños directos sobre el DNA. (Calvo, 2007; Lancini GC, 1995).

A nivel biotecnológico, los actinomicetos son unos los microorganismos con mayor explotación para la obtención de metabolitos potenciales, los géneros con mayor estudio y con mayor

producción de compuestos activos son *Streptomyces*, *Saccharopolyspora*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora* y *Actinoplanes* (Solanki R, 2008). Los componentes producidos por actinomicetos tienen un número cercano a 13000 y de estos, los de amplio uso en la actualidad son: antibacterianos como estreptomicina, eritromicina y cloranfenicol, antifúngicos como nistatina, antivirales como tunicamicina, antiparasitarios como avermectina, inmunosupresores como rapamicina, antitumorales como actinomicina, mitomicina C y antraciclina, entre otros (Quiñones-Aguilar, 2016).

Los metabolitos secundarios son moléculas orgánicas complejas, producidas por diversas cadenas de reacciones enzimáticas, confieren una gran variabilidad en la actividad biológica producida, diferenciándose dos grupos, los bactericidas que eliminan el crecimiento de microorganismos (amplio espectro) y los bacteriostáticos que bloquean el crecimiento del microorganismo patógeno (bajo espectro) (Romero, 2014) . Dentro de estos grupos se destacan cuatro modos de acción, los que actúan sobre las membranas celulares que afectan la actividad selectiva de la membrana, los que actúan como inhibidores de la síntesis de la pared celular dejando vulnerable a la célula, algunos que actúan como inhibidores de la síntesis proteica, produciendo el colapso en la estructura y funciones celulares y los que inhiben procesos de replicación bacteriana (Guilhelmelli, 2013).

La búsqueda en la industria de nuevos componentes activos para el control bacteriano ha disminuido en la actualidad, producto de la alta inversión para el crecimiento, aislamiento y purificación de los compuestos producidos. Es importante resaltar que la probabilidad de

aislamiento de una cepa de actinomiceto productora de un metabolito activo es de 1 entre 10000 aislados (Uzcátegui Negrón, 2013; Arasu, 2013; Aponte Ubillus, 2015).

Injuria bacteriana estimulación para producción de metabolitos secundarios

En actinomicetos la activación del metabolismo secundario para obtención de metabolitos activos se ha realizado a partir de diferentes mecanismos y herramientas para aumentar. El método con mayor aplicación biotecnológica se sustenta en la injuria bacteriana que es la inducción de ambientes estresantes generados por la variación de las condiciones óptimas de crecimiento bacteriano, por ejemplo la modificación en la fuente principal de carbono, temperatura, pH, humedad, y el ingreso de sustancias tóxicas, estimulantes o ajenas al medio (Chaudhary, 2013; Sugiyama, 2015).

Principales grupos de moléculas producidas por actinomicetos (PKS, NRPS e híbridos).

El crecimiento y desarrollo bacteriano es formado por reacciones metabólicas primarias, que buscan la producción de moléculas esenciales para las funciones vitales en los microorganismos. Las reacciones metabólicas secundarias, generalmente activadas por acción externa como la injuria bacteriana son productoras de metabolitos no esenciales o acompañantes de procesos proteicos secundarios (Staunton, 2001; Hertweck, 2009)

Los metabolitos bacterianos secundarios son los que mayor uso industrial presentan en la actualidad, por ser moléculas vinculadas a series de reacciones enzimáticas que confieren regulación o inhibición de sistemas bacterianos ajenos (Fischbach, 2006). Dentro de los metabolitos secundarios se encuentran los policétidos, que son compuestos con estructura y sitio

de acción variable, responsables de aproximadamente un tercio de los productos farmacológicos utilizados en tratamientos terapéuticos como eritromicina, rifamicina, rapamisina, lovastatina, etc., y estrechamente relacionados con la biosíntesis enzimática de las policétido sintetetasas (Castillo R. D., 2017). Los productos de policétidos comprenden a polifenoles, macrólidos, polienos y poliésteres, entre otros (Santana, 2017).

Tipos de PKS

La clasificación de los PK

Se es de acuerdo a la organización de los dominios enzimáticos, para el montaje de la cadena policetónica, organizando los PKS tipo I, II y III, aunque los tipo III se reportan en su mayoría para plantas superiores (Rimando, 2007) Tabla 1.

Tabla 1. Tipos de PKS. Fuente: (Hertweck., 2009, pag 18-32)

| Tipo de PKS | Bloques de Construcción | Organismos |
|---|---|---|
| Tipo 1: modulares (no iterativas); subtipo: cis-AT, trans - AT | ACP*, varias unidades de extensión | Bacterias |
| Tipo 1: Iterativas; subtipo NR, PR, HR, PKS | ACP*, solo malonil-CoA como unidad de extensión | Principalmente hongos y algunas bacterias |
| Tipo II: iterativas | ACP*, solo unidades de extensión de malonil-CoA | Exclusivamente de Bacterias |

| | | |
|-----------------------------|--|---|
| Tipo III: iterativas | Acil-CoA solo malonil-CoA como unidad de extensión | Principales plantas, algunas bacterias, hongos y animales |
| Híbridos PKS-NRPS | ACP*, malonil-CoA, aminoácidos como unidad de extensión | Bacterias (modulares) y Hongos (iterativos) |

ACP: Proteína acarreadora de grupos acilo.

PKS TIPO I

Complejos multienzimáticos de tamaños variables sintetizados por la enzima sintetasas I, poseen diferentes dominios catalíticos para la estructuración de cadenas policétidicas con organización modular, se encuentran involucrados en la biosíntesis de policétidos poliéteres y macrólidos.

Los PKS tipo I iterativos son reconocidos por ser un módulo el responsable del alargue de la cadena policetónica con varias repeticiones; los PKS tipo I no iterativos la cadena policetónica solo realiza un paso por el módulo para su elongación (Hertweck., 2009).

PKS TIPO II

Son complejos multienzimáticos conformados por varias proteínas, con acción iterativa para la formación de la cadena, estos son los responsables de la síntesis de policétidos aromáticos (Rimando, 2007).

PKS TIPO III.

Son un subtipo de enzimas con menor complejidad estructural y catalítica a los PKS TIPO I y II, son proteínas homodiméricas que actúan de forma repetitiva para la formación de policétidos aromáticos en su mayoría monocíclicos (Sanz, 2005).

NRPS

Son péptidos no ribosomales sintetizados por enzimas sintetetasas, en su mayoría son toxinas, sideróforos, pigmentos, antibióticos e inmunosupresores, comparten con los PKS de módulos con dominios obligatorios, esenciales para la adición de péptidos y otros dominios para modificar los péptidos en la cadena policétidica (Castillo R. D., 2017).

Híbridos NRPS/PKS

Las similitudes entre los dominios PKS y NRPS tanto estructurales y catalíticas, han permitido la formación de complejos híbridos NRPS/PKS, los complejos de enzimas formados han proporcionado una mayor variabilidad de metabolitos secundarios y potenciales moléculas de interés (Du L, 2001). Ejemplos de policétidos tipo I, II, NRPS e híbridos (Figura 7).

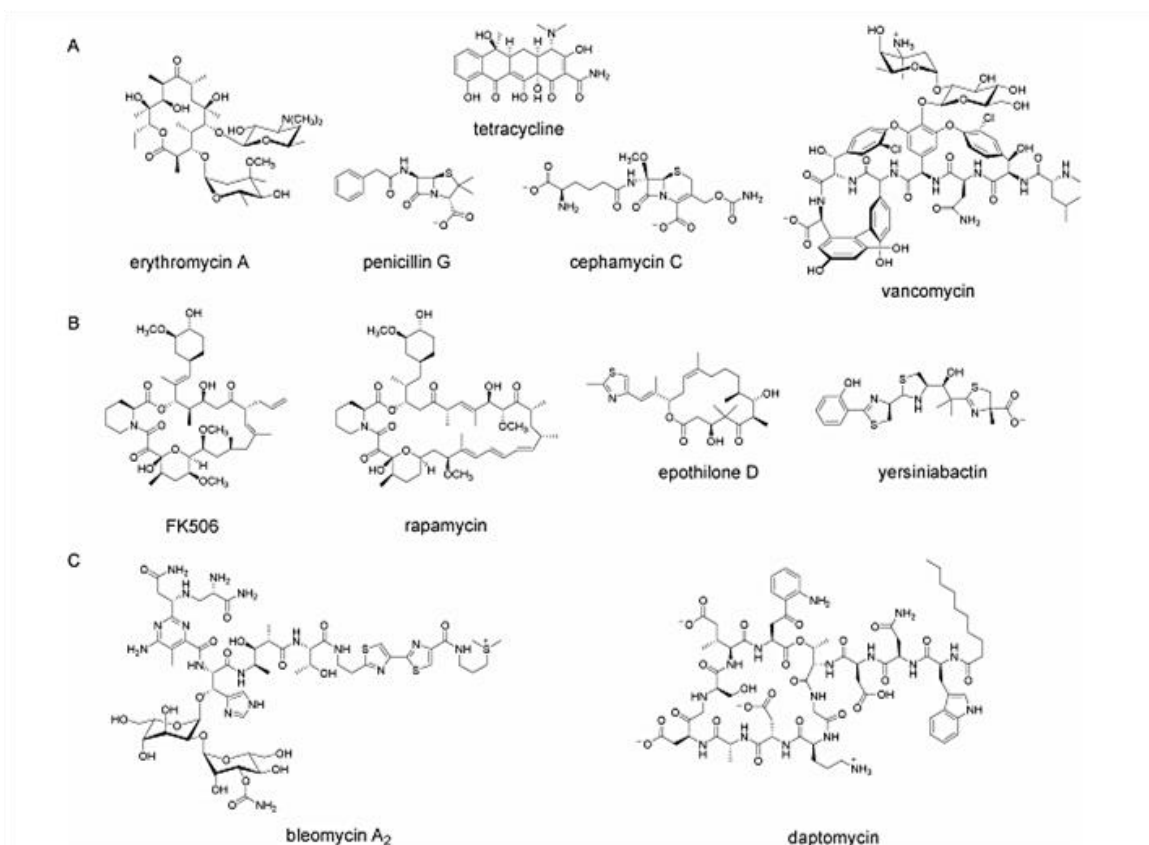


Figura 7. Policétidos PKs PNR e híbridos PK-NRP terapéuticamente relevantes.

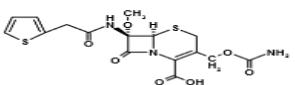
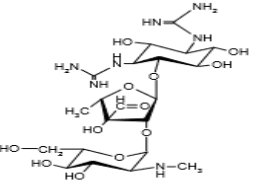
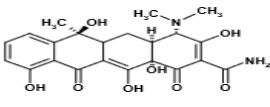
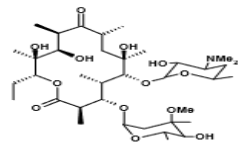
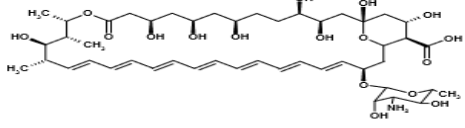
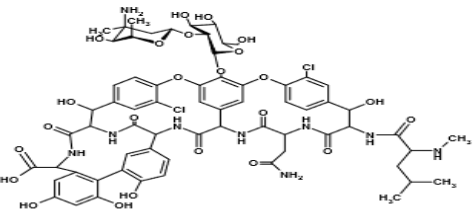
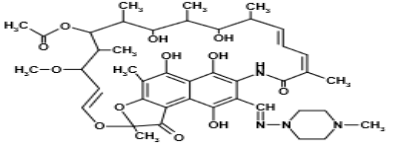
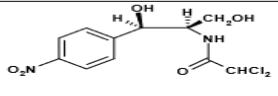
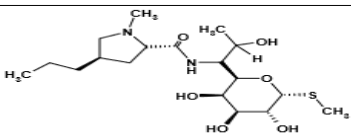
Fuente: (Fischbach, 2006, pag 2).

Antibióticos sintetizados a partir de PKS, NRPS e Híbridos.

A partir de los grupos de moléculas anteriores, se han producido grupos de antibióticos clasificados en familias por compartir estructuras y mecanismos químicos similares. La tabla 2 describe los principales antibióticos producidos por actinomicetos, su estructura química y su sitio de acción. (Lancini GC, 1995).

Tabla 2. Clasificación de antibióticos producidos por actinomicetos por familias.

Fuente: (Evangelista-Martínez, 2007, pag 4-6).

| CLASIFICACION | ANTIBIÓTICO | ESTRUCTURA |
|---------------------|---|--|
| β -Lactámicos | Cefoxitina. (Cefamicina semisintética). Inhibe síntesis de pared celular. |  |
| Aminoglucósidos | Estreptomina. Inhibe síntesis de proteínas. Unión en la subunidad ribosomal 30S. |  |
| Tetraciclinas | Tetraciclina. Inhibe síntesis de proteínas. Unión en la subunidad ribosomal 30S. |  |
| Macrólidos | Eritromicina. Inhibe síntesis de proteínas. Unión en la subunidad ribosomal 50S. |  |
| Polienos | Amfotericina B. Alteración de permeabilidad en la membrana. |  |
| Glicopéptidos | Vancomicina. Inhibe síntesis de pared celular. |  |
| Rifamicinas | Rifampicina. Inhibición de síntesis de RNA. Unión a la RNA polimerasa. |  |
| Fenicoles | Cloranfenicol. Inhibe síntesis de proteínas. Unión en la subunidad 50S. |  |
| Azúcares complejos | Lincomicina. Inhibe síntesis de proteínas. Unión en la subunidad 50S. |  |

Infecciones bacterianas en el departamento de Nariño

Los reportes de infecciones bacterianas en la comunidad Colombiana son elevados y con altas tasas de recurrencia, cerca de 40% de los casos epidemiológicos son producidos en mujeres y 12% atribuidos a hombres (Foxman B, 2002) ; el registro de los aislados bacterianos causantes de dichas infecciones son escasos, sin embargo, los antecedentes indican que el patógeno *Escherichia coli* es responsable de 70 a 95% de las infecciones (Sivick KE M. H., 2010) y *Staphylococcus aureus* patógeno prevalente en infecciones urinarias en la población perteneciente a la tercera edad o inmunocomprometida en un 35% (Cruz, 2018).

ANTECEDENTES

El aumento en el número de enfermedades causadas por microorganismos que adquirieron resistencia a antibióticos de primera y segunda generación se transforma en un problema crítico y de alta prioridad, el problema se ha acelerado con el mal uso de medicamentos, que unido a la transferencia de genes incrementó la adquisición de resistencia y la inoperatividad de los tratamientos a infecciones. Por esto, la búsqueda de nuevas fuentes, metodologías y protocolos ha formado parte clave en la obtención de metabolitos secundarios producidos por actinomicetos, con potenciales en la inhibición de bacterias patógenas y otros usos industriales (Martínez-Trujillo, 2012).

La búsqueda de nuevos hábitats que no han sufrido explotación humana, es la principal fuente de bacterias productoras de metabolitos secundarios potenciales, justificada en la obtención de una mayor diversidad de especies; la investigación de Kumari, K. y colaboradores en 2017 comprueban como el aislamiento de actinomicetos de suelos sin explotar, es alto y la presencia de aislados con metabolitos potenciales cercano a 15 % (metabolitos con acción inhibitoria), indicando la alta probabilidad de obtener potenciales metabolitos en zonas o nichos no explorados (Kumari, 2017).

De igual manera la investigación realizada por Nafis y colaboradores en 2017, en nuevos nichos ecológicos, encontraron que aproximadamente 20 % de sus aislados eran potenciales productores de metabolitos con actividad antifúngica. Igualmente, Ganesan y colaboradores en 2017 realizaron el aislamiento de actinomicetos de diferentes suelos, reportando que 34% de los aislados presentaron actividad antimicrobiana y antifúngica de patógenos resistentes, las dos

investigaciones indican que nichos sin exploración son potenciales para el descubrimiento de moléculas activas.

Un factor limitante en la diversidad y composición de las comunidades de actinomicetos es la temperatura, asociada a un crecimiento óptimo a temperaturas entre 28 y 35 °C (Gebreyohannes, 2013), G. et al., 2013), sin embargo, la investigación realizada por Shah, A. y colaboradores en 2017, reportó el crecimiento de actinomicetos en nuevas regiones altitudinales de Kashmir Himalaya, que tienen temperaturas máximas de 24 °C, obteniendo un total de 121 aislados, de los cuales 18 % presentaron actividad antimicrobiana de patógenos (Shah, 2017).

Las condiciones específicas de un nuevo nicho como el manglar, pueden ser determinantes en la composición de actinomicetos y metabolitos. La investigación de Palla, M. y colaboradores en 2018, menciona como un nuevo nicho como el manglar brinda una serie de propiedades, atributos y redes de interacción que puedan determinar la potencialidad de metabolitos producidos, las condiciones alta de salinidad y la amplia fuente de materia orgánica disponible, generaron la producción acelerada de una mayor concentración de metabolitos. El estudio se centró en el género *Streptomyces* por ser el género mayor productor de metabolitos, esta investigación evaluó la capacidad antifúngica contra la levadura *Candida albicans* y reportó que *Streptomyces hydrogenans* presentó el mayor potencial antifúngico.

Una fuente estudiada son las asociaciones entre actinomicetos, plantas y animales, influyentes en la síntesis de metabolitos potenciales. La investigación realizada por Liu, C. y colaboradores en

2017, encontró una asociación entre líquenes y actinomicetos, obteniendo 213 aislados, de los cuales 22.5 % presentaron actividad antimicrobiana (Liu, 2017).

Hussaini, S. Z., & Gulve, R. en 2017, investigaron el control sobre bacterias Gram negativas con el aislamiento de actinomicetos de sedimentos de cuerpos de agua dulce, en este estudio se encontró que 25 % de los aislados presentaron acción inhibitoria de las bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhi*), modificando el esquema de obtención aislados, a partir de cuerpos de agua dulce (Hussaini, 2017).

Actualmente la incorporación de herramientas tecnológicas como la metagenómica y minería de genes, han aportado en nuevas formas para la obtención de metabolitos secundarios potenciales, en la revisión realizada por Niu, G. en 2017, se menciona como la construcción de librerías genómicas pueden ser importantes para la identificación de la diversidad de genes y rutas metabólicas en actinomicetos, involucrados en la producción compuestos con propiedades inhibitoras de bacterias resistentes (Niu, 2017).

Finalmente, la incorporación de elementos activos en las células de actinomicetos ha promovido el aumento en la producción y efecto inhibitorio de sus metabolitos, la investigación realizada por Rasool, U., & Hemalatha, S. en 2017, incorporó a nivel celular nanopartículas de cobre, sustentado en la mejora de la eficiencia en procesos enzimáticos, antimicrobianos, antifúngicos y anticancerosos (Rasool, 2017).

METODOLOGÍA

Selección de la zona de muestreo y obtención de muestras de suelo

La selección de la zona para la obtención de las muestras de suelo, se encuentra guiada por parámetros ideales para el crecimiento de actinomicetos, como la composición química y la estructura física, que a su vez son determinantes del material geológico, la cubierta vegetal, los factores climáticos y la topografía, donde la actividad humana también pasa a formar un papel importante en la variación y modificación del sustrato, producto de procesos agrícolas e industriales (Schaetzl, 2015).

El departamento de Nariño posee una alta variación altitudinal, que ha conformado características ambientales únicas, formadoras de una compleja distribución de plantas y animales que a su vez determinan la composición de la materia orgánica e inorgánica en el suelo. Por lo anterior, la presente investigación seleccionó el bosque húmedo de la Reserva Natural Río Ñambi, reconocida por su alto nivel de conservación, bajo nivel de intervención antropogénica y alta disponibilidad de materia orgánica en el suelo, ideal para el crecimiento de actinomicetos (Codazzi, 2001).

La Reserva Natural Río Ñambi ubicada en el municipio de Barbacoas, corregimiento de Altaquer, cubre un área aproximada de 1500 hectáreas, en su mayoría formadas por bosque pluvial premontano, se encuentra ubicada entre los 1100 y 1900 m.s.n.m; la reserva es caracterizada por sus altos índices de humedad, resultado de valores de precipitación media anual cercanos a los 8000 mm y por su temperatura promedio de 19 °C (Figura 8) (Codazzi, 2001).

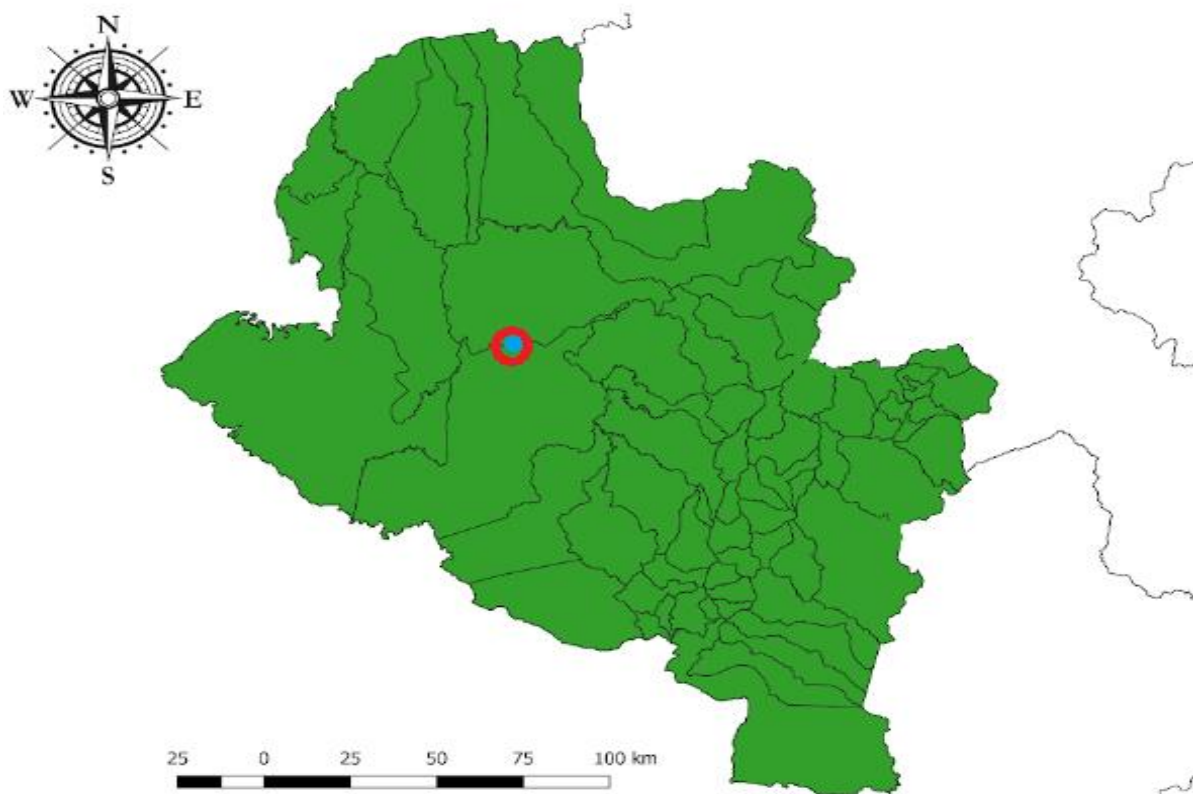


Figura 8. Ubicación geográfica de la zona de estudio.

Bosque húmedo de la reserva natural Río Ñambi. Fuente: Diseño gráfico con el Software QGIS Girona V 3.0.

Se seleccionaron extensiones de terreno conservadas, de estas se tomaron tres muestras representativas de suelo de forma aleatoria con el método de Zig Zag (Andriulo, 2017), el terreno de muestreo presentó caracteres homogéneos en relación a la composición del material parental, sin intervención antropogénica y sin zonas pendientes, garantizando que la muestra sea representativa de la zona de trabajado. Los puntos muestreados presentaron alta materia orgánica en descomposición, formadora un olor terroso indicativo de la presencia de Geosmina producida por actinomicetos.

Los puntos de muestreo de suelo seleccionados pasaron inicialmente por un proceso de eliminación de la cobertura vegetal conformada por pastos, raíces y hojas. Posteriormente, se realizó una perforación en “V” en el terreno de 15 cm de los cuales se eliminó 2 cm de la capa superior y se depositó en bolsas ziploc (Figura 9) (Delgado, 2015).

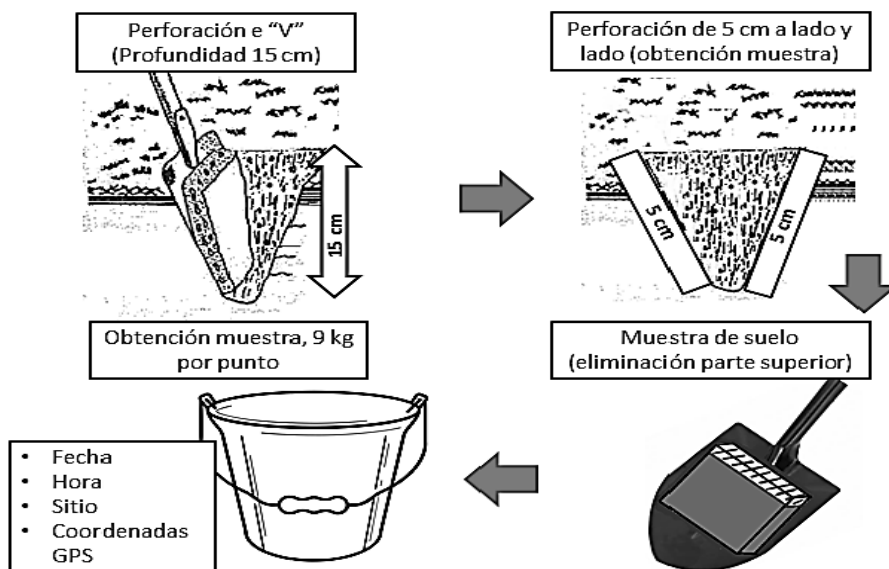


Figura 9. Protocolo de obtención muestras de suelo (3 puntos). Fuente: esta investigación

Transporte de muestras de suelo

Las muestras fueron depositadas en recipientes estériles a 4 °C, se aplicó cadena de frío para disminuir los procesos de degradación, la actividad metabólica y la variación en los componentes fisicoquímicos del suelo. El transporte se realizó en un tiempo menor a 72 horas, parámetros establecidos para los análisis de suelo y el aislamiento bacteriano (Gómez Giraldo, 2013).

Las tres muestras de suelo inicialmente pasaron por un proceso de homogeneización en recipientes estériles y posteriormente un cuarteo del suelo homogeneizado para su distribución en las diferentes pruebas (Figura 10). Para el aislamiento bacteriano se tomaron 30 g del

homogeneizado de suelo por cada punto, proceso realizado en los laboratorios 604 Y 404 de Microbiología de la Universidad de Nariño.

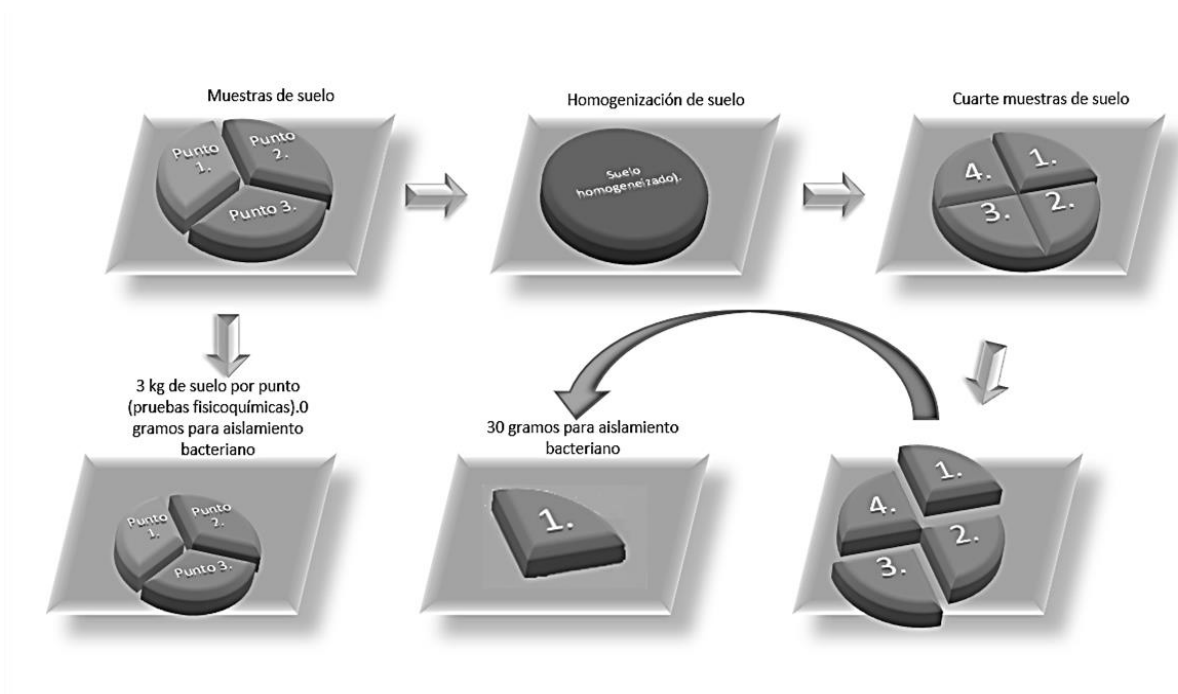


Figura 10. Homogeneización y cuarteo de las muestras de suelo por punto.

Determinación de componentes fisicoquímicas del suelo

Los análisis fisicoquímicos del suelo son una herramienta que permite evaluar el grado de disponibilidad de nutrientes y elementos determinantes del crecimiento bacteriano e influyentes en su distribución, riqueza y abundancia (Priyadharsini, 2015).

En campo se realizó la medición de pH, temperatura, luminosidad y humedad del suelo (Ramos Vásquez, 2008; Santamarina, 2008). Los análisis fisicoquímicos de suelo fueron realizados a partir de 3 kilogramos por punto (Tomás R. C.-B., 2012) en el laboratorio de suelos agrícolas de la Universidad de Nariño, los parámetros químicos analizados fueron Intercambio catiónico, Materia orgánica, Fósforo, Calcio, Magnesio, Potasio, Aluminio, Hierro, Manganeso, Cobre, Zinc, Boro,

Nitrógeno, Carbono y Azufre y los parámetros físicos analizados fueron la densidad aparente (Tomás R. C., 2012).

Aislamiento de Actinomicetos y Extracción de Metabolitos

Diluciones seriadas para aislamiento de actinomicetos

En condiciones asépticas, se tomaron 10 gramos del homogenizado del total de 30 g por cada punto y se depositaron en 90 mL de agua peptonada a 1 %, la solución se homogeneizó en vortex formando la dilución 10^{-1} . El proceso se repitió hasta la obtención de la dilución 10^{-7} (Arguello-Navarro, 2014).

De las diluciones anteriores, se seleccionaron 10^{-3} , 10^{-5} y 10^{-7} (Martínez Z. et al., 2017). Por cada dilución se tomó 100 μ L y se sembró por triplicado de forma masiva en los medios de cultivo bacteriano (Agar de aislamiento de actinomicetos (AIA), Agar Almidón Amoniacal (AAA), Agar Sacarosa Almidón (ASA) y Agar Almidón Caseína (AAC) cada medio fue suplementado con Nistatina (antifúngico); los medios inoculados se incubaron a 30 °C por un tiempo máximo de 30 días, en los cuales se realizó observación constante de la formación de colonias características de actinomicetos para su respectivo aislamiento (Pérez-Rojas, 2015).

Perfil morfológico para identificación de actinomicetos

Se realizó la caracterización morfológica de los aislados. Inicialmente se observó de forma macroscópica estructuras como micelio vegetativo, micelio aéreo, esporas, margen del aislado y elevación y a su vez se registró la coloración del micelio, esporas y presencia de exudado (metabolito), finalmente, a nivel microscópico se realizó tinción de Gram (Garrity, 2001; Frade, 2018).

Análisis de crecimiento bacteriano

Se inocularon los aislados en 200 mL de caldo AIA, se realizaron mediciones de crecimiento bacteriano cada 4 horas inicialmente y posteriormente cada 8 por un total de 92 horas, las mediciones de crecimiento se llevaron a cabo con medidas de absorbancia a 530 nm en el espectrofotómetro *UV-VIS Prove 3000*. Las absorbancias obtenidas se analizaron en curvas de crecimiento (absorbancia Vs tiempo).

Conservación de aislados

Los aislados purificados se sembraron por triplicado de forma masiva sobre el agar AIA, pasados 12 días se añadió 1 mL de agua peptona a 1% sobre los aislados ya esporulados y se hizo un raspado sobre el micelio, la solución se filtró con algodón y se centrifugó en tubos falcón, el precipitado conformado por esporas fue trasladado a criotubos donde se incorporó glicerol a 30 % y se llevó a refrigeración a -20 °C para su conservación (Baltz, 2010).

Producción de metabolitos

Los aislados fueron inoculados en Erlenmeyers que contenían 200 mL de caldo de producción para actinomicetos (R5) (Kieser, 2000), con agitación de 180 rpm, temperatura de 30 °C por 10 días. A partir de los 7 días el medio de cultivo de los diferentes aislados cambió de color, activando el metabolismo secundario por los limitados nutrientes y la modificación en el pH del medio.

Extracción y purificación de metabolitos secundarios

Al medio R5 de cada aislado, se le adicionaron 100 mL de Acetato de etilo y se dejó en agitación por dos horas a 180 rpm y por una hora a 90 rpm; la solución obtenida se llevó a decantación, el sobrenadante superior que contiene el solvente y los componente miscibles totales fueron llevados a rota evaporación en el equipo *Heidolph Rotary Evaporator Hei VAP*, la solución final fue

almacenada con la menor cantidad de solvente (Garrido, 2006; Maldonado Cepeda, 2010; Floros, 2016).

Inhibición y Citotoxicidad de los Aislados

Pruebas inhibitorias de los metabolitos

Para la activación de las cepas patógenas preservadas en criotubos *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, se inoculó las colonias en el caldo Luria Bertani (LB) y ajusto a un patrón general de turbidez el crecimiento bacteriano (0,5 en la escala Mc Farland).

Prueba de antagonismo

Se realizó siembra por punción por triplicado en medio AIA de los 11 aislados y se llevó a incubación a 30 °C por 7 días donde se observó la formación de esporas y la producción de metabolitos (manifestado en exudados o modificación en la coloración del medio). Posteriormente, se incorporó Agar Müller-Hinton Blando (MH) (conformado por 6 ml de Agar MH y 1 ml de las colonias patógenas en caldo LB) sobre los aislados y se llevó a incubación por 24 y 48 horas.

La presencia de halos fue registrada como antagonismo positivo (+), el crecimiento normal de la bacteria patógena se registró como negativo (-).

Prueba de inhibición por pozos

Se trabajó el método de doble capa con un diámetro de 6 mm con sacabocados por cada pozo en Agar MH. Inicialmente se realizó por triplicado la inoculación de 20 µL de metabolito por cada aislado en cada pozo, se tomó como control negativo agua destilada estéril y como control positivo Amoxicilina; para confirmar que el solvente Acetato de etilo no era el productor de la inhibición se lo inoculó por triplicado. Finalmente, se incorporó una capa de Agar MH blando con las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Rojas, 2005).

Prueba de inhibición por sensidiscos

Se trabajó con Agar MH y con sensidiscos de diámetro de 5mm. Inicialmente se realizó siembra masiva de cada una de las bacterias patógenas, consecutivamente, por triplicado se inoculó 20 μ L de los metabolitos de cada aislado en los sensidiscos, se tomó como control positivo (+) Amikasina y como control negativo (-) agua destilada estéril, para confirmar que el solvente Acetato de etilo no era el productor de la inhibición se lo inoculó por triplicado (Rojas, 2005).

Los halos producidos por los aislados en las pruebas con pozos y sensidiscos fueron medidos con un Calibrador Pie de Rey en mm, el crecimiento intermedio reportado como bacteriostático también fue medido.

Prueba de concentración mínima inhibitoria (MIC)

Se inocularon las bacterias resistentes *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en tubos con caldo LB hasta la obtención de un valor de 0,5 en la escala Mc Farland. En placas de micro dilución 12x8 se adicionaron 80 μ L de caldo estéril MH, 10 μ L de la solución anterior, se incorporó 10 μ L de metabolito total a diferentes concentraciones (concentraciones: 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, 0,39% y 0,19%), la columna 11 se tomó como control positivo (sin inoculación de metabolito) y la columna 12 como control negativo (con amoxicilina), se llevó a incubación por 24 horas a 37 °C. Finalmente, se incorporó 40 μ L de Cloruro de trifenil-tetrazolium y se incubó nuevamente por 12 horas (Castillo R. D., 2017; León, 2019). Las lecturas de Concentración mínima se realizaron como positivas cuando el medio cambio a coloración roja (crecimiento bacteriano positivo) y como negativas cuando el medio no modificó su color (crecimiento bacteriano negativo).

Prueba de Hemólisis (citotoxicidad)

Se llevó a crecimiento los 11 aislados en Agar sangre a 3 y 5 %, se incubó a 30 °C por 7 días y se registró la formación de lisis (alfa o beta) o la ausencia de lisis (gamma), las bacterias que formaron hemólisis gamma fueron tomadas como aislados con mayor potencial para la extracción de un metabolito con baja toxicidad (Bernal, 2015; Lamilla, 2018).

Identificación del Metabolito Producido por la Colonia con Mayor Potencial Inhibitorio

Determinación de componentes totales del metabolito por HPLC C18

El metabolito del aislado con la mayor actividad inhibitoria se llevó a Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con Columna 18 (C18), se usó como fase móvil (A) agua+ 0,1% ácido fórmico y (B) acetonitrilo + 0,1% de ácido fórmico; se exploró de 5 a 100 % por 20 minutos para la determinación de los componentes activos totales (Chaparro Pedraza, 2010).

Extracción y amplificación de DNA

Basado en el manual Practical Streptomyces genetics del año 2000, se seleccionó el método Salting Out como el mejor para la extracción de DNA en los aislados, se realizaron unas modificaciones para mejoras en el proceso de extracción (Kieser, 2000).

Extracción de DNA Salting Out

Se inoculó los 11 aislados en caldo TSB y se llevó a incubación por 5 días hasta observar crecimiento bacteriano. Posteriormente, se centrifugó y el pellet formado por cada aislado se conservó para las extracciones. De estos se tomaron 50 µL y se los resuspendió en 500 µL de Buffer SET, después se adicionaron 10 µL de lisozima (10 mg. ml⁻¹) y se llevó a incubación por una hora a 37 °C con agitación cada 10 minutos.

Consecutivamente, se adicionaron 14 µL de proteinasa K, 60 µL de SDS a 10% y 200 µL de NaCl 5M, se mezcló por inversión y se llevó a incubación por dos horas a 55 °C, después se dejó

enfriar hasta los 37 °C y se añadió 500 µL de cloroformo, se mezcló en vortex y se incubó por 30 minutos a 20 °C y después se llevó a centrifugación por 15 minutos a 6000 rpm.

El sobrenadante se transfirió a nuevos tubos eppendorf y se le incorporó 0.6 volúmenes de isopropanol, se mezcló por inversión y se llevó a centrifugación a 4 °C por 20 minutos a 14000 rpm, el sobrenadante resultante fue eliminado y se le incorporó al sedimento 5 volúmenes de etanol a 70 %, se llevó a centrifugación por 10 minutos a 14000 rpm, el sobrenadante obtenido se eliminó y el sedimento fue secado a 37 °C hasta observar la evaporación total del etanol. El DNA final se resuspendió en 30 µL de Agua milliQ y se dejó a 4 °C por 12 horas, finalmente se refrigeró a -20 °C.

Cuantificación de ADN

La calidad de la extracción de ADN se verificó en un gel de agarosa 1% en una cámara de electroforesis *Cleaver scientific Ltd a* (70/300 cm²) voltios por 90 minutos, el marcador utilizado fue Lambda λHind III (Promega). La corrida electroforética se observó en transiluminador *Accuris Instruments SMARTDOC TM.*-

La concentración final de DNA se obtuvo con el Nanodrop, posteriormente se llevó todas las muestras a la misma concentración para la amplificación del gen 16S rRNA.

Amplificación del gen 16S rRNA

Para la amplificación del gen 16S rRNA, se utilizaron los cebadores universales 27F [AGAGTTTGATCMTGGCTCAG] y 1041R [CGGTGTGTACAAGACCC].

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se realizó en un volumen final de 25 µL, formado por 16,375 µL de Agua MilliQ, 5 µL Buffer Colorless 5X (Promega), 1 µL de MgCl₂ 2.5

mM (Promega), 0,5 μ L de una mezcla dNTP 2.5 mM, 0,5 μ L de cada cebador (27F y 1041R), 0,125 μ L de ADN polimerasa GoTaq R (Promega) (5U / μ L) y 1 μ L de DNA a 15 ng / μ L.

Se aplicaron los siguientes ciclos de amplificación: inicialmente se dejarán por 2 minutos a 95 °C para desnaturalización inicial, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 2 minutos, 55 °C por 1 minuto y 72 °C por 3 minutos, con una elongación final a 72 °C durante 10 minutos. Todas las reacciones se realizaron en un termociclador en tubos Eppendorf de 0,2 ml.

Los fragmentos de ADN amplificados por PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa a 1% en tampón TAE 1X por 90 minutos a 70 Voltios. Se utilizó el marcador molecular 1 Kb (Promega). Los fragmentos de ADN amplificados se visualizaron bajo luz ultravioleta en el equipo *Accuris Instruments SMARTDOC TM*.

Los amplicones se enviaron para secuenciación a Corpogen con número de contrato 064S-B-2019-SEC. Las secuencias obtenidas se editaron utilizando el programa ClustalW y BLAST, para la secuencia parcial del gen 16S rRNA y se alinearon con secuencias de nucleótidos almacenadas en las bases de datos GenBank / Ribosomal Database Project / NCBI.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Colecta de muestras de suelo

La muestra de suelo para el primer punto se colectó a una altura de 1400 m.s.n.m con coordenadas N 01°, 17.1' 29", W 0.78°, 0,41', 470", para el segundo punto se colectó a una altura de 1444 m.s.n.m con coordenadas N 01°, 17', 62", W 78°, 4', 453" y para el tercer punto con una altura de 1428 m.s.n.m y coordenadas N 01°, 17', 117", W 78°, 4', 419".

Los puntos de extracción presentaron capas de hojarasca con aproximadamente 20 mm de altura, confirmando la alta disponibilidad de materia orgánica para el desarrollo bacteriano y ausencia de inclinación, tránsito o retención de cuerpos de agua que influyan en la composición bacteriana y en los componentes fisicoquímicos del suelo.

Análisis fisicoquímico de suelos

La cuantificación de fósforo (P), magnesio (Mg), potasio (K), cobre (Cu) y azufre (S) en los tres puntos es menor a la reportada por Codazzi y colaboradores (2001) y USDA, (1999) para componentes fisicoquímicos de suelo (Tabla 3.). La composición de los macronutrientes P, Mg, K y S reporta inferior a la óptima para suelos (Codazzi, 2001), contribuyó al bajo desarrollo bacteriano por establecer factores limitantes vinculados a procesos metabólicos primarios vitales (Villanueva, 2011). Los actinomicetos son uno de los microorganismos con alta especificidad por cierto tipo de moléculas para su crecimiento como los azúcares, las bajas concentraciones de estos macronutrientes en el medio restringió el normal crecimiento de algunos actinomicetos. Los procesos de degradación microbianos son influyentes en las condiciones ácido-básicas del suelo y

formadores de presiones selectivas sobre organismos con bajas tolerancias a la modificación del pH. Este factor posiblemente influyó en la composición de la población de actinomicetos aislados.

El punto tres presentó los valores más bajos de los elementos analizados (50 % del total de pruebas) en relación a los otros puntos, predominando con bajos contenidos de fósforo (P), calcio (Ca), magnesio (Mg), manganeso (Mn), cobre (Cu), zinc (Zn) y Azufre (S). (Tabla 3, fila C), dificultando los procesos metabólicos vinculados al crecimiento bacteriano. A diferencia del punto 1, el cual solo presentó bajas cantidades en 17 % de las pruebas, estableciendo el punto con las mejores condiciones para el aislamiento bacteriano (Tabla 3.).

Las variaciones en los componentes fisicoquímicos en las muestras de suelo están determinados por la composición vegetal y animal circundante, además, las condiciones micro climáticas de cada punto establecen la formación de nuevas redes de interacciones modificantes de los componentes presentes. Las bajas concentraciones de algunos elementos o nutrientes influyeron en la diversidad y abundancias de los aislados obtenidos como lo reporta Aguilera en el año 2000.

Tabla 3. Análisis Fisicoquímico de las Muestras de Suelo

| PUNTO | 1 (A) | 2 (B) | 3 (C) |
|---------------------------|--------------|--------------|--------------|
| | 4,43 | 4,36 | 4,45 |
| Potenciómetro (pH) | Ácido | Ácido | Ácido |
| Materia orgánica | 32 | 24,5 | 19,7 |
| (%) | Alto | Alto | Alto |
| | 13,6 | 4,83 | 4,33 |
| Fósforo (mg/Kg) | Bajo | Bajo | Bajo |

| | | | |
|----------------------------|-------|-------|-------|
| Intercambio | 71,7 | 59,1 | 49,3 |
| catiónico (cmol/Kg) | Alto | Alto | Bajo |
| Calcio (cmol/Kg) | 7,66 | 0,24 | 0,08 |
| | Alto | Bajo | Bajo |
| Magnesio (cmol/Kg) | 2,48 | 0,36 | 0,37 |
| | Medio | Bajo | Bajo |
| Potasio (cmol/Kg) | 0,6 | 0,27 | 0,29 |
| | Alto | Bajo | Bajo |
| Aluminio (cmol/Kg) | 2,15 | 4,86 | 2,68 |
| | Alto | Alto | Alto |
| Hierro (mg/Kg) | 205 | 190 | 113 |
| | Alto | Alto | Alto |
| Manganeso (mg/Kg) | 10,1 | 0,4 | 1,2 |
| | Alto | Bajo | Bajo |
| Cobre (mg/Kg) | 0,47 | 0,93 | 0,84 |
| | Bajo | Bajo | Bajo |
| Zinc (mg/Kg) | 1,78 | 0,93 | 0,84 |
| | Medio | Bajo | Bajo |
| Boro (mg/Kg) | 0,18 | 0,33 | 0,38 |
| | Bajo | Medio | Medio |
| Nitrógeno (%) | 0,78 | 0,71 | 0,63 |
| | Alto | Alto | Alto |

| | | | |
|------------------------|----------|----------|----------|
| Carbono (%) | 18,6 | 14,2 | 11,4 |
| | Alto | Alto | Bajo |
| Azufre (mg/Kg) | 10,3 | 4,13 | 2,37 |
| | Medio | Bajo | Bajo |
| Densidad (g/cc) | 0,55 | 0,4 | 0,7 |
| | Orgánico | Orgánico | Orgánico |

Nota: Los elementos con medición en cantidades fueron registrados con interpretaciones de Alto (muy frecuente), Medio (Frecuente) y Bajo (escaso).

Los factores fisicoquímicos con mayor influencia en el crecimiento de actinomicetos fueron: pH, materia orgánica, intercambio catiónico, potasio (K), aluminio (Al), hierro (Fe), boro (B), nitrógeno (N) y carbono (C), por presentarse en frecuencias altas o medias en el suelo y generaron el mayor número de aislados por punto de extracción.

Tabla 4. Pruebas Fisicoquímicas Tomadas en Campo

| PUNTO | 1 | 2 | 3 |
|---------------------------|----------|----------|----------|
| Potenciómetro (pH) | 6,8 | 7,1 | 7,1 |
| Luminosidad | 80 | 110 | 110 |
| Humedad | 2 | 4 | 4,5 |

Nota: Los valores de Luminosidad tienen escala de 0 a 2000 y los valores de humedad escala de 0 a 10

Aislamiento bacteriano

Los componentes fisicoquímicos analizados en las tablas 3 y 4 indicaron como la presencia de ciertos componentes fueron de mayor importancia, reflejado en el punto dos con 6 aislados bacterianos, seguido por el punto tres con 4 aislados y el punto uno con 1 aislado (Tabla 5). La alta o baja concentración del óptimo para suelos en micronutrientes influyó en la composición bacteriana, por ser esenciales en bajas concentraciones. Algunos micronutrientes en altas cantidades son tóxicos, influyendo en la absorción de otros componentes y formando compuestos con mayor complejidad, que incide en el balance ácido- base del suelo.


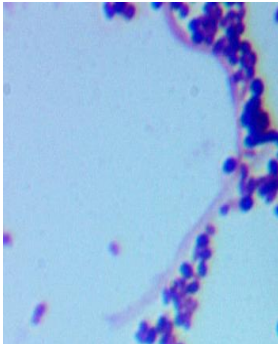
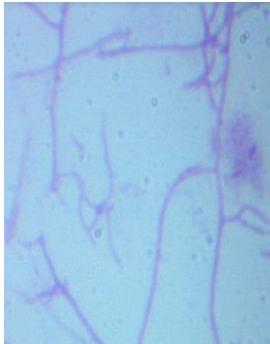
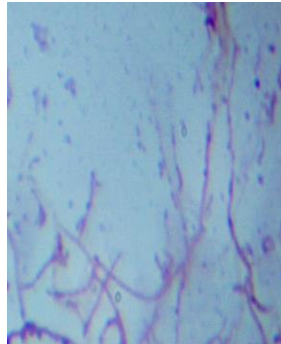
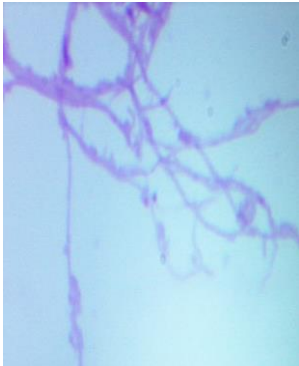



El aislamiento y purificación bacteriana se realizó en el Agar AIA suplementado con Nistatina (Antifúngico), por presentar el mayor crecimiento y número de aislados con características semejantes a actinomicetos con fuentes de carbono y nitrógeno similares a las observadas en las muestras de suelo. Las características macroscópicas para selección de los aislados se reportan en la Tabla 6 y las características morfológicas microscópicas basadas en la tinción de Gram en la Figura 11.

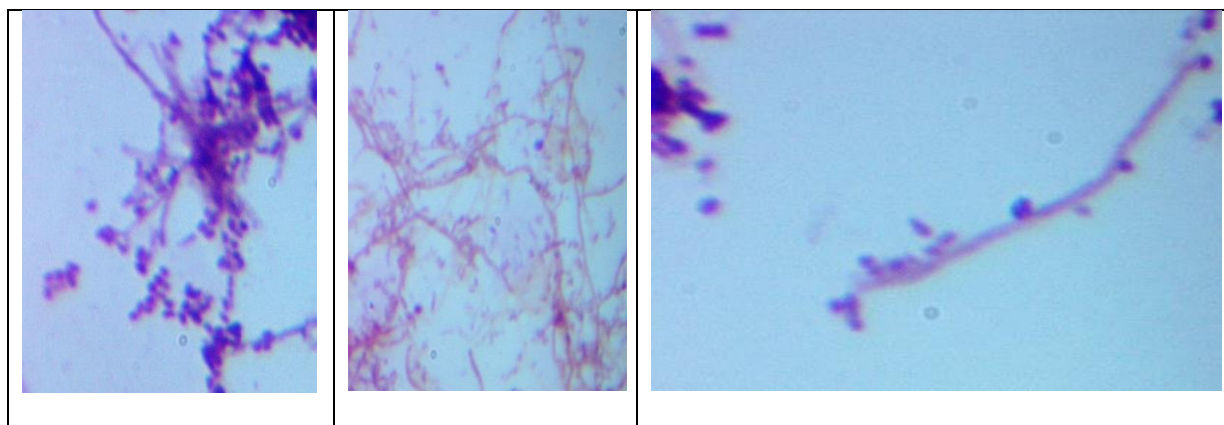
Los aislados obtenidos fueron codificados con referencia al punto de aislamiento (p1, p2, p3), la dilución madre (-3, -5, -7) y el número en secuencia en que fue aislado.

Tabla 5. Aislados Bacterianos con Morfología Semejante a Actinomicetos

| Punto | Aislados | Medio |
|--------------|-----------------|--------------|
| 1 | 1 | AIA |
| 2 | 6 | AIA |
| 3 | 4 | AIA |

Nota: El agar AIA fue seleccionado como medio de aislamiento por presentar el mayor número de colonias

| <i>Tinción de Gram 11 Aislados</i> | | | |
|---|---|--|---|
| A | B | C | D |
|  |  |  |  |
| E | F | G | H |
|  |  |  |  |
| I | J | K | |
| | | | |



Nota: Aislados bacterianos: p1718 (A), p2758 (B), p2559 (C), p2360 (D), p2761 (E), p2763 (F), p2566 (G), p3569 (H), p3770 (I), p3371 (J), p3772 (K). Algunos aislados presentan micelio y esporas

Figura 11. Tinción de Gram aislados (usaron la misma magnificación para todas las imágenes?)

Tabla 6. Características macroscópicas de los aislados.

Observación Macroscópica de los Aislados

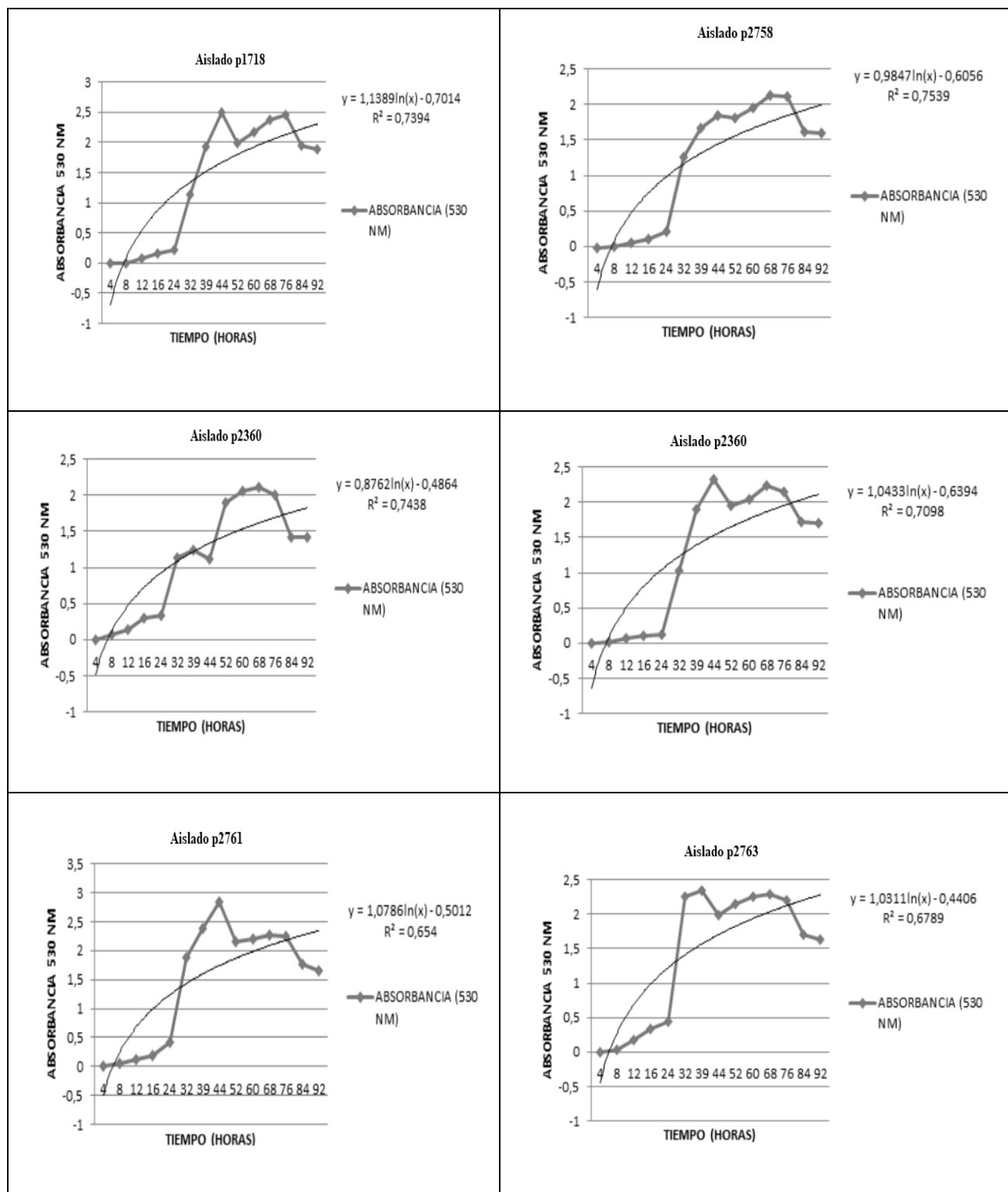
| Aislado | Textura | Margen | Consistencia | Color Anverso | Color Reverso | Pigmento | Elevación |
|----------------|----------------|---------------|---------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|------------------|
| P1718 | Seca | Irregular | Terrosa | Gris | Gris Oscuro | Transparente-amarillo | Baja |
| P2758 | Seca | Irregular | Terrosa | Gris | Marrón Oscuro | Amarillo Claro | Baja |

| | | | | | | | |
|--------------|------|-----------|-------------------|-----------------|------------------|--------------------|------|
| P2559 | Seca | Irregular | Arenosa | Gris Claro | Gris Oscuro | Transparente | Baja |
| P2360 | Seca | Irregular | Terrosa | Marrón | Marrón | Amarillo opaco | Baja |
| P2761 | Seca | Irregular | Terrosa | Gris | Gris- Marrón | Amarillo oscuro | Baja |
| P2763 | Seca | Redondo | Arenosa | Amarilla | Marrón | Naranja oscuro | Baja |
| P2566 | Seca | Irregular | Arenosa Blanda | Abanó | Abanó | Naranja | Baja |
| P3569 | Seca | Irregular | Terrosa | Blanco | Marrón | Amarillo | Baja |
| P3770 | Seca | Irregular | Terrosa | Gris- Blanco | Gris | Amarillo claro | Baja |
| P3371 | Seca | Irregular | Terrosa | Gris | Gris Oscuro | Amarillo opaco | Baja |
| P3772 | Seca | Irregular | Arenosa | Gris Claro | Marrón Oscuro | Amarillo oscuro | Baja |

Nota: Las observaciones macroscópicas se realizaron con los aislados esporulados

De los aislados obtenidos se realizó la extracción de esporas y su conservación en criotubos con glicerol a 30 % a -20 °C.

Curvas de crecimiento de los aislados



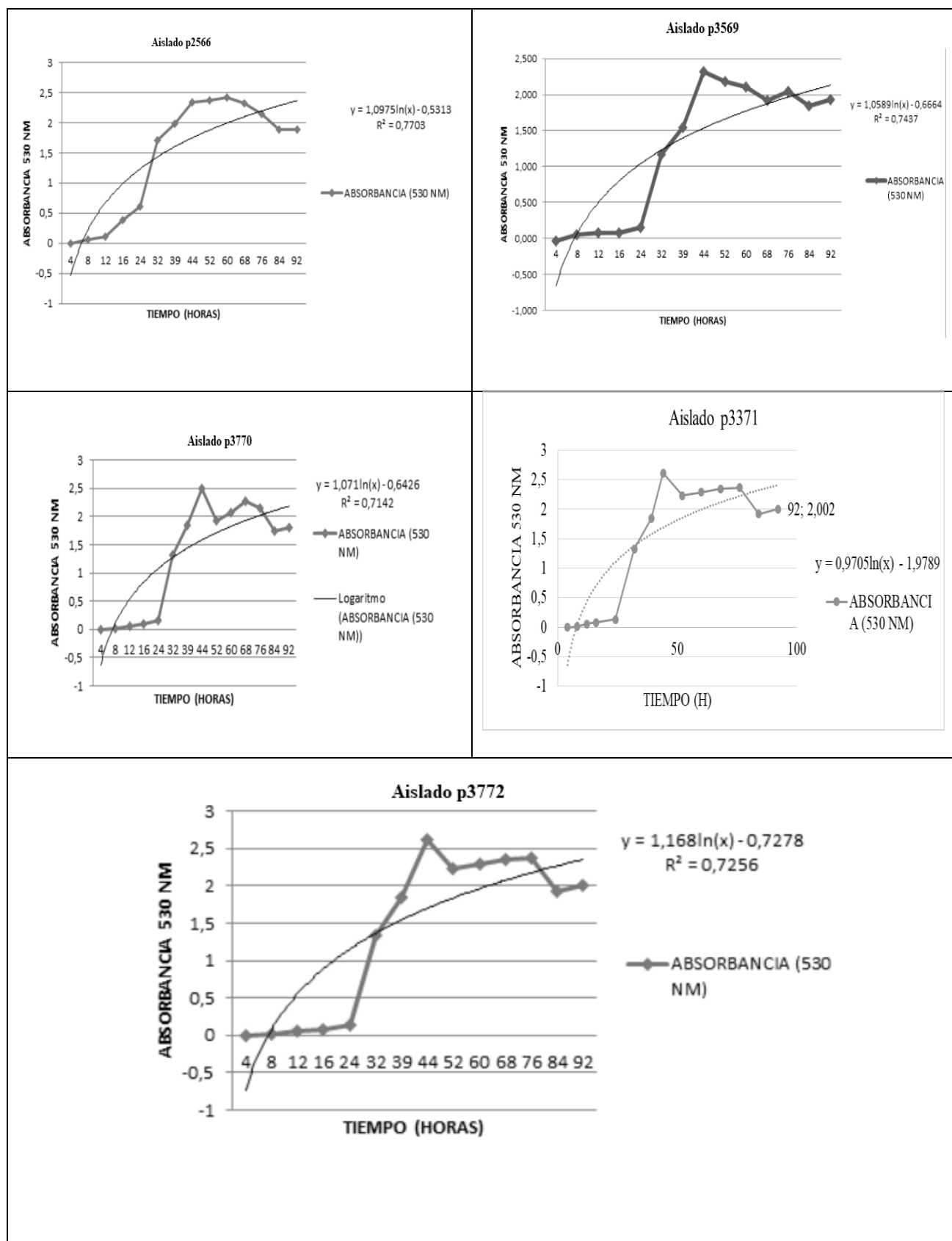


Figura 12. Curva de crecimiento de los aislados.

Los aislados p2360, p2763, p2761 y p3770 al igual que los aislados p3569, p3371 y 03772 presentan curvas de crecimiento similares, posiblemente estos aislados pertenezcan al mismo género de actinomiceto.

A las 52 horas todos los aislados generaron un declive en su crecimiento, indicando el inicio de la fase de latencia producido por la reducción en los componentes del caldo. También indica el inicio de estrés bacteriano por la disminución del sustrato y la potencial activación de la ruta metabólica secundaria responsables de la producción de la mayoría de metabolitos activos (Figura 12).

Producción y extracción de metabolitos

El medio de producción seleccionado fue R5 por observarse la mayor producción de metabolitos secundarios (variación en la coloración del caldo). La producción de metabolitos se observó a partir de los 7 días evidenciados con el cambio de coloración de los caldos de cultivo. La extracción realizada con el solvente acetato de etilo formó una capa sobrenadante que se llevó a rotaevaporación. Los extractos finales obtenidos (Figura 13) fueron almacenados con la menor concentración de solvente.

Los extractos de los aislados p2559, p2763 y p3371 presentaron dos fases por lo cual se realizó separación, rotulando la fase superior normalmente (p2559, p2763 y p3371) y la fase inferior (p2559.1, p2763.1 y p3371.1).

| <i>Metabolitos Extraídos de los Aislados</i> | | | |
|--|---|---|---|
| A | B | C | D |

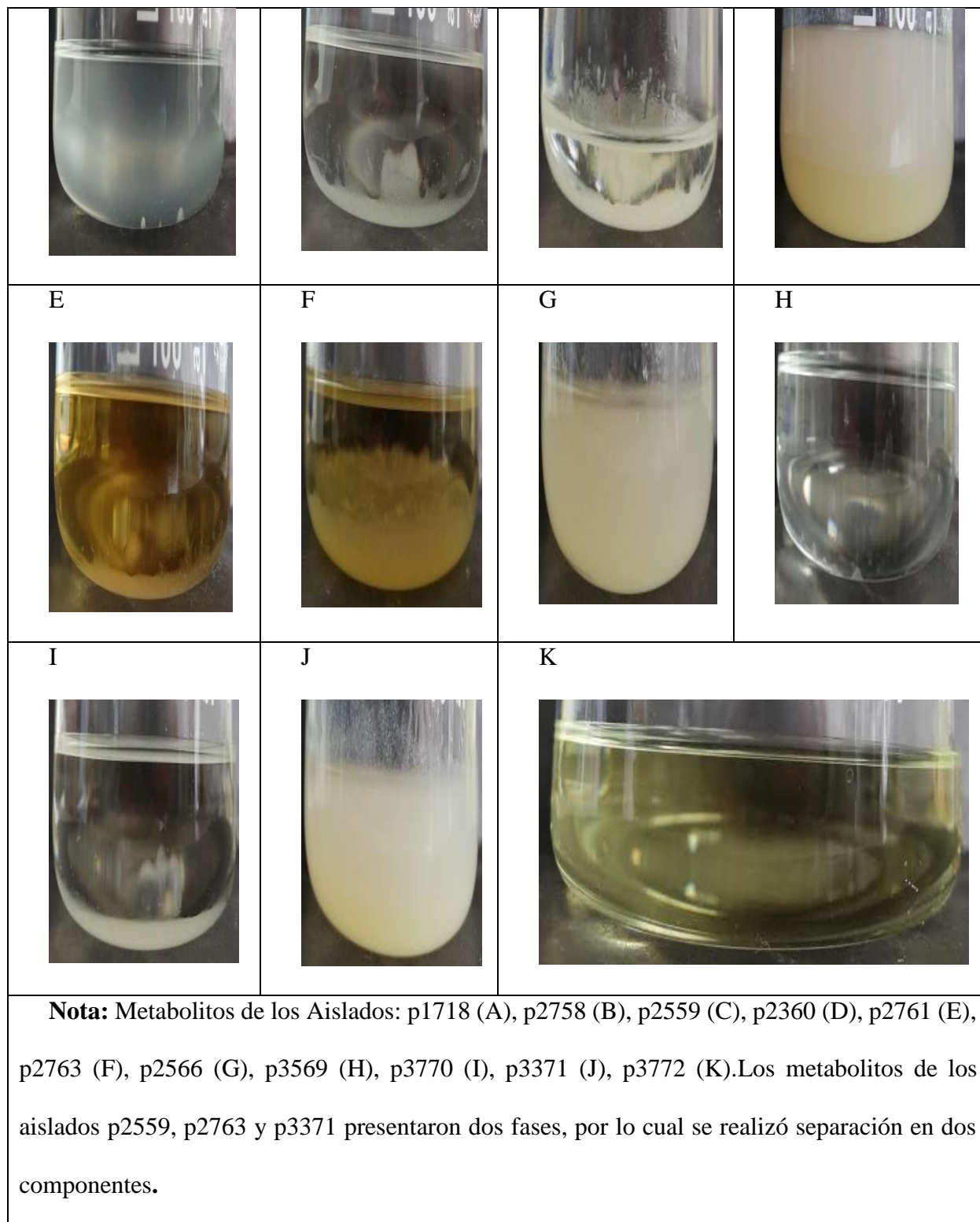


Figura 13. Metabolitos extraídos con solvente Acetato de etilo

Perfil de resistencia de las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

Tabla 7. Perfil de Resistencia a Antibióticos de las Bacterias Patógenas

| Antibióticos | <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
|-----------------------------------|-------------------------|------------------------------|
| Penicilina (P10) | R | S |
| Ampicilina (AM) | S | - |
| Amoxicilina (AMX) | I | - |
| Cefotoxima (CTX) | R | S |
| Trimetoprima/sulfametoxazol (SXT) | R | - |
| Gentamicina (CN) | S | - |
| Aztreonam (ATM) | R | R |
| Ciprofloxacina (CIP) | R | - |
| Imipenem (IPM) | S | - |
| Amikasina (AK) | S | S |

Nota: Las siglas R (Resistente), I (intermedio) y S (sensible) indican la sensibilidad a los antibióticos (Guerrero, 2019)

Las bacterias patógenas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* asociadas a infecciones bacterias, se encuentran catalogadas por la OMS dentro de la lista de prioridad crítica (OMS, 2017). Los perfiles de resistencia obtenidos indican que *Escherichia coli* es una bacteria Panresistente y *Staphylococcus aureus* una bacteria Multiresistente (Tabla 7.) (Mensa, 2018).

Los niveles tan altos de resistencia a antibióticos en especial cuando es de múltiples familias, son una prioridad principal para los centros de salud pública y la comunidad en general. La emergencia sanitaria por resistencia bacteriana ha incrementado descontroladamente desde la aparición de los primeros antibióticos y tiende a convertirse en la fuente de la siguiente era de mortalidad humana, por ser las opciones terapéuticas para este tipo de infecciones limitadas y no siempre óptimas para su tratamiento (Oteo, 2014)

La obtención de resultados positivos con la capacidad inhibitoria de los aislados brinda una potencial solución de tratamiento para las infecciones bacterianas producidas por bacterias patógenas resistentes.

Pruebas de capacidad inhibitoria de los aislados

Se realizó la evaluación de la capacidad inhibitoria de los aislados con las pruebas de Antagonismo e inhibición por pozos y sensidiscos. De los resultados obtenidos el aislado con mayor capacidad inhibitoria fue seleccionado para la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC).

Antagonismo

La prueba de antagonismo de los 11 aislados reveló que 5 aislados (45.45 %) presentaron actividad antagónica frente a *Escherichia coli* y 4 aislados (36.36 %) presentaron actividad antagónica frente a *Staphylococcus aureus*. Los aislados p2566 y p3569 fueron positivos con los dos patógenos (Tabla 8.).

Al igual que las investigaciones realizadas por Jalali, H. y colaboradores, (2016), Khucharoenphaisan K. y colaboradores (2012) y Usha, R. y colaboradores (2011), que reportaron actividad antagónica de actinomiceto aislados de diferentes nichos sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, la investigación encontró aislados productores de metabolito potenciales

para el control de estos patógenos. Sin embargo, la prueba antagónica no reflejó la mejor acción inhibitoria de todos los aislados, posiblemente la difusión del metabolito o la activación del metabolismo secundario no fueron desarrollados en esta prueba, generando antagonismos negativos.

Tabla 8. Prueba de Antagonismo por Método en Doble Capa

| Aislado | <i>Escherichi a coli</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
|--------------|------------------------------|----------------------------------|
| p1718 | — | — |
| p2758 | + | — |
| p2559 | — | — |
| p2360 | + | — |
| p2761 | — | — |
| p2763 | + | — |
| p2566 | + | + |
| p3569 | + | + |
| p3770 | — | + |
| p3371 | — | + |
| p3772 | — | — |

Nota: Prueba positiva (+) con la observación de antagonismo, prueba negativa (—) con la observación de crecimiento normal del patógeno.

Inhibición por pozos

De los 14 extractos obtenidos sólo el extracto p3772 (7.14 %) presentó inhibición sobre *Escherichia coli* y los extractos p2758, p2360 y p3772 (21.42 %) presentaron inhibición sobre *Staphylococcus aureus* con el método por difusión en pozos (Tabla 9). Se observó una generación de halos mayor a la presentada en antagonismo por ser facilitada la movilización y difusión de los componentes.

Tabla 9. Prueba de Inhibición por Pozos Medido en (mm)

| Aislado | <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
|---------|-------------------------|------------------------------|
| p1718 | 0 | 0 |
| p2758 | 0 | 9 |
| p2559 | 0 | 0 |
| p2559.1 | 0 | 0 |
| p2360 | 0 | 16 |
| p2761 | 0 | 0 |
| p2763 | 0 | 0 |
| p2763.1 | 0 | 0 |
| p2566 | 0 | 0 |
| p3569 | 0 | 0 |
| p3770 | 0 | 0 |
| p3371 | 0 | 0 |
| p3371.1 | 0 | 0 |

p3772 10,1 15.66

Acetato de etilo 0 0

Nota: Se inoculó por triplicado el solvente Acetato de etilo para confirmar que no interviene en la generación de inhibición

Inhibición por sensidiscos

De los 14 extractos obtenidos, los extractos p2559.1, p2360, p2761, p2763, p2763.1, p3770 y p3772 (50%) presentaron actividad inhibitoria frente a *Escherichia coli*, los extractos p1718, p2559y p3371.1 (21.42 %) presentaron actividad reguladora o controladora (bacteriostática) de *Escherichia coli*, observada en la baja concentración de colonias alrededor del sensidiscos. Sólo el extracto p3772 (7.14 %) presentó actividad inhibitoria sobre *Staphylococcus aureus*, los extractos p1717, p2763.1 y p3770 (21,42 %) presentaron actividad bacteriostática de este patógeno (Tabla 10).

Tabla 10. Prueba de Inhibición por Sensidiscos medido en (mm)

| Aislado | <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
|----------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| p1718 | 3,3 | 3 |
| p2758 | 0 | 0 |
| p2559 | 2,55 | 0 |
| p2559.1 | 8.5 | 0 |
| p2360 | 17.8 | 0 |

| | | |
|-------------------------|-------|-------|
| p2761 | 8.5 | 0 |
| p2763 | 13.32 | 0 |
| p2763.1 | 16.83 | 3 |
| p2566 | 0 | 0 |
| p3569 | 0 | 0 |
| p3770 | 11.2 | 2,66 |
| p3371 | 0 | 0 |
| p3371.1 | 4.16 | 0 |
| p3772 | 9.76 | 15,33 |
| Acetato de etilo | 0 | 0 |

Nota: Se inoculó por triplicado el solvente Acetato de etilo para confirmar que no interviene en la generación de inhibición

En las pruebas de inhibición con pozos y sensidiscos se realizó la inoculación del solvente Acetato de etilo, verificando que el solvente no es el productor de la actividad inhibitoria, porque los metabolitos se encontraban disueltos en una fracción mínima del solvente. El resultado obtenido fue negativo en las dos pruebas, indicando que la actividad inhibitoria era realizada por los metabolitos aislados (Tabla 10.).

Investigaciones realizadas por Belyagoubi y colaboradores (2018), Guevara y colaboradores (2017), Pérez y colaboradores (2015) y Gebreyohannes (2013) presentan que de 8 a 45 % de los metabolitos aislados de actinomicetos tienen actividad inhibitoria similar a la reportada en esta investigación. Sin embargo, el número de reportes anuales de investigaciones realizadas con

bacterias Multiresistentes o Panresistentes asociadas a infecciones humanas es menor en comparación al reportado para bacterias contaminantes de alimentos, dando una potencial fuente de inhibición de patógenos en otros sectores de interés.

Concentración mínima inhibitoria

Los valores obtenidos en las pruebas de antagonismo e inhibición por pozos y sensidiscos indicaron al aislado p3772 como el productor de metabolitos con capacidad inhibitoria de las bacterias patógenas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

La prueba de Concentración Mínima Inhibitoria realizada en placas de micro dilución (8X12), la fila número 11 se trabajó como control positivo sin la inoculación de metabolito (coloración roja) y la fila número 12 fue tratada con el antibiótico Amoxicilina y reportada como control negativo (coloración amarilla) (Tabla 11.).

Tabla 11. Concentración Mínima Inhibitoria de los Metabolitos Producidos por el Aislado p3772

| Pozos | Concentración | <i>Escherichia coli</i> | |
|--------------|----------------------|--------------------------------|------------|
| | % | Sensibilidad | |
| 1 | 100 | — | SENSIBLE |
| 2 | 50 | — | SENSIBLE |
| 3 | 25 | — | SENSIBLE |
| 4 | 12,5 | — | SENSIBLE |
| 5 | 6,25 | — | SENSIBLE |
| 6 | 3,12 | ± | INTERMEDIO |
| 7 | 1,56 | — | SENSIBLE |

| | | | |
|-----------|---|---|------------|
| 8 | 0,78 | — | SENSIBLE |
| 9 | 0,39 | ± | INTERMEDIO |
| 10 | 0,19 | ± | INTERMEDIO |
| 11 | Control positivo (ausente de metabolito) | + | RESISTENTE |
| 12 | Control negativo (Amoxicilina) | — | SENSIBLE |

Nota: Sensible (> 5 pozos con inhibición), Intermedio (5 a 4 pozos con inhibición) y Resistente (< 4 pozos con inhibición).

El porcentaje de acción antimicrobiana de los metabolitos totales para *Escherichia coli* se presentaron hasta la concentración 0,78 %. En la concentración 3,12 % de metabolito se observó un efecto intermedio de inhibición, reflejado por el crecimiento bacteriano en 3 pozos, esto posiblemente indique que se necesitan concentraciones superiores a 3.12 % para la obtención de actividad inhibitoria (Tabla 11).

Tabla 12. Concentración Mínima Inhibitoria de los Metabolitos Producidos por el Aislado p3772

| Pozos | Concentración % | <i>Staphylococcus aureus</i> Sensibilidad | |
|--------------|----------------------------|--|----------|
| 1 | 100 | — | SENSIBLE |
| 2 | 50 | — | SENSIBLE |

| | | | |
|----|---|---|------------|
| 3 | 25 | — | SENSIBLE |
| 4 | 12,5 | — | SENSIBLE |
| 5 | 6,25 | — | SENSIBLE |
| 6 | 3,12 | — | SENSIBLE |
| 7 | 1,56 | + | RESISTENTE |
| 8 | 0,78 | + | RESISTENTE |
| 9 | 0,39 | — | SENSIBLE |
| 10 | 0,19 | ± | INTERMEDIO |
| 11 | Control positivo (ausente de metabolito) | + | RESISTENTE |
| 12 | Control negativo (Amoxicilina) | — | SENSIBLE |

Nota: Sensible (> 5 pozos con inhibición), Intermedio (5 a 4 pozos con inhibición) y Resistente (< 4 pozos con inhibición).

La prueba de Concentración Mínima Inhibitoria para *Staphylococcus aureus* indica efectividad del metabolito hasta la concentración 3,12 % (Tabla 12.).

La comparación en los resultados obtenidos en la prueba MIC, revelaron que el metabolito p3772 presenta inhibición de las bacterias patógenas (Rodrigues, 2018), posiblemente producto de los variados metabolitos extraídos con el solvente, observando mayor sensibilidad de *Escherichia coli* por el metabolito.

Los perfiles de sensibilidad obtenidos indican diferentes mecanismos de resistencia y difusión de compuestos de las bacterias patógenas blanco frente al metabolito (Carvalho, 2016), observados

en la inhibición de los componentes presentes en el metabolito p3772 por *Escherichia coli* bacteria Panresistencia.

Prueba de hemolisis.

Tabla 13. Prueba de Hemolisis

| Aislado | (α , β o γ) |
|---------|-----------------------------------|
| p1718 | Gamma |
| p2758 | Gamma |
| p2559 | Gamma |
| p2360 | Gamma |
| p2761 | Gamma |
| p2763 | Gamma |
| p2566 | Gamma |
| p3569 | Gamma |
| p3770 | Beta |
| p3371 | Beta |
| p3772 | Gamma |

Nota: Procesos hemolíticos son vinculados a producción de metabolitos

Se realizó la prueba de hemólisis en Agar Sangre (AS) al 3 y 5%. Las observaciones obtenidas en la concentración a 3 % fueron nulas, no se presentó ningún tipo de hemólisis bacteriana. Posteriormente, se realizó observaciones en la concentración a 5 %, obteniendo resultados hemolíticos en los aislados p3370 y p3371 (18.18 %), los 9 aislados restantes no presentaron hemólisis (Tabla 13). En relación al aislado p3772 la no presencia de citotoxicidad genera un potencial metabolito para uso en procesos celulares.

Determinación de componentes totales por HPLC C18

Tabla 14. Condiciones cromatograficas

| N° | Tiempo | Flujo | %A | %B | %C | Curva |
|----|--------|-------|------|-----|-----|-------|
| 1 | 0.01 | 1.00 | 95.0 | 5.0 | 0.0 | 6 |
| 2 | 5.00 | 1.00 | 50.0 | 50. | 0.0 | 6 |
| | | | | 0 | | |
| 3 | 10.00 | 1.00 | 20.0 | 80. | 0.0 | 6 |
| | | | | 0 | | |
| 4 | 15.00 | 1.00 | 95.0 | 5.0 | 0.0 | 6 |
| 5 | 18.00 | 1.00 | 95.0 | 5.0 | 0.0 | 6 |

Se realizó ajuste en el tiempo de corrida cromatograficas, reduciendo estos hasta los 20 minutos, buscando una mayor separación de lo componente presentes en el metabolito del aislado p3772 (Tabla 14.).

Cromatograma del metabolito a 270 nm

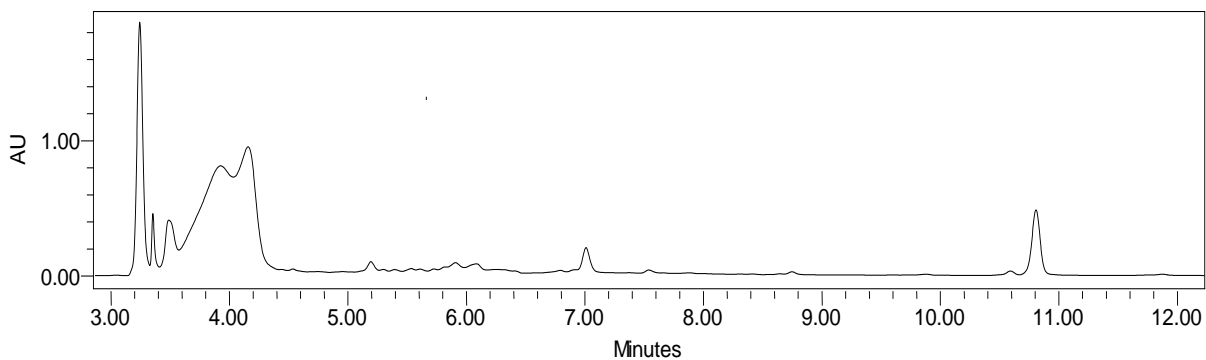


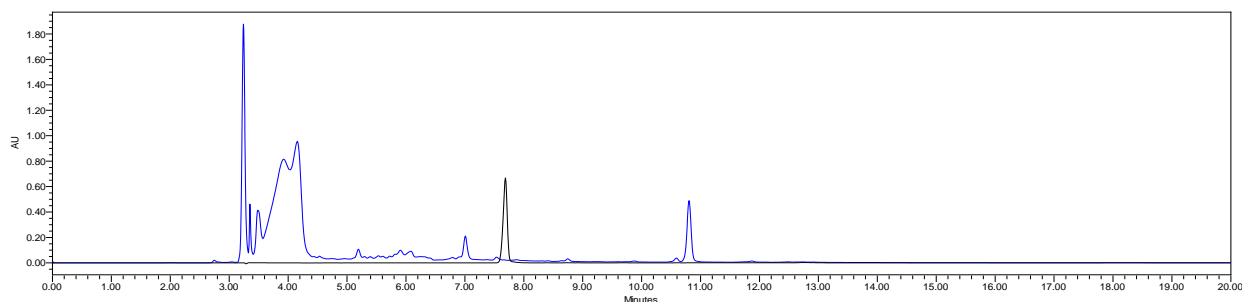
Figura 14. Cromatograma del metabolito extraído del aislado p3772.

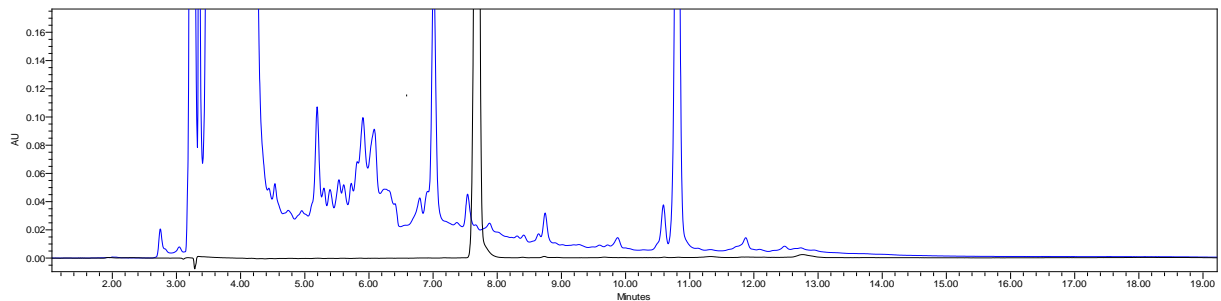
Se realizó la corrida cromatográfica del metabolito total p3772 a 270 nm, la Figura 14 indica la detección de diferentes compuestos dentro del metabolito analizado, esto generado por la extracción total de componentes miscibles en el solvente Acetato de etilo (Figura 14.).

Para la observación de los posibles metabolitos involucrados con la capacidad inhibitoria, se realizaron corridas cromatográficas de los antibióticos Ampicilina, Estreptomicina, Eritromicina y Cloranfenicol, se aplicaron iguales condiciones cromatográficas utilizadas en la corrida del metabolito (Tabla 14), sin embargo, solo se obtuvo detección del antibiótico cloranfenicol en un tiempo de retención de 7,8 minutos con una pureza superior a 95 % (Figura 15).

Cromatograma metabolito Vs cloranfenicol a 270 nm

A.



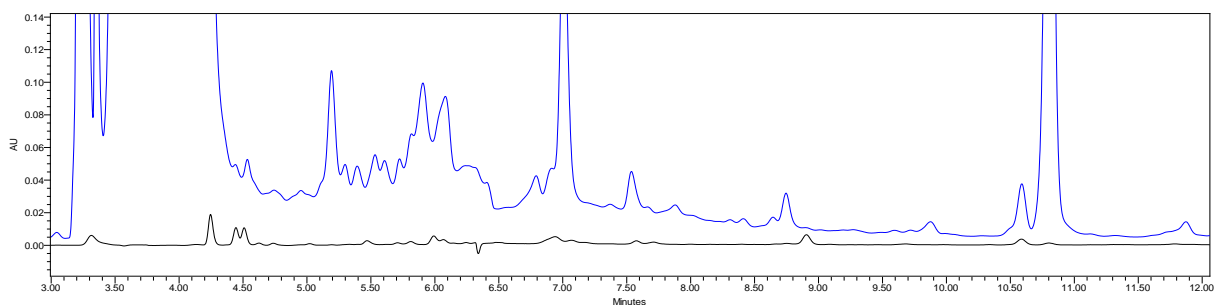
B.

Nota: Metabolito en coloración azul y Antibiótico Cloranfenicol en coloración negra.

Figura 15. Cromatograma metabolito del aislado p3772 Vs cloranfenicol. A. metabolito a escala normal, B. aproximación del metabolito con el antibiótico.

Se realizó la corrida cromatografica de los componentes extraídos del caldo de producción R5 estéril con el solvente Acetato de Etilo, utilizando el cromatograma obtenido como medio blanco. El resultado obtenido en la Figura 16, no indica relación entre los componentes presentes en el medio blanco y el metabolito p3772, por presentar el medio blanco picos de retención con índices inferiores a 0,5 %, (incertidumbre con alta significación). Por lo anterior, los componentes observados en el cromatograma son productos metabólicos del aislado p3772 (Figura 16.).

Cromatograma metabolito Vs medio blanco a 270nm



Nota: Metabolito en coloración azul y Medio blanco en coloración negra.

Figura 16. Cromatograma medio blanco (caldo de cultivo R5) vs metabolito del aislado p3772

Los resultados obtenidos en el cromatograma del metabolito (Figura 13), indican la presencia de 12 compuesto representativos con valores superiores a 0,5 %, indicando la presencia de diferentes componentes vinculados a procesos inhibitorios (Tabla 15).

Tabla 15. Componentes representativos en el metabolito p3772

| Nombre | Tiempo de retención | Área | % Área | Altura | Peak Lambda Max. |
|---------------|--------------------------------|-------------|-------------------|---------------|---------------------------------|
| 1 | 3.243 | 6191 015 | 34.17 | 182843 8 | 205.9 |
| 2 | 3.353 | 5955 31 | 3.29 | 386304 | 200.0 |
| 3 | 3.487 | 1161 835 | 6.41 | 274393 | 210.6 |
| 4 | 3.895 | 3049 744 | 16.83 | 232872 | 204.7 |
| 5 | 4.173 | 3418 562 | 18.87 | 488552 | 204.7 |
| 6 | 5.194 | 2221 05 | 1.23 | 64080 | 200.0 |
| 7 | 5.908 | 1304 10 | 0.72 | 33534 | 225.9 |
| 8 | 6.088 | 1972 | 1.09 | 37358 | 230.6 |

| | | | | | |
|-----------|--------|------|-------|--------|-------|
| | | 02 | | | |
| 9 | 7.009 | 6712 | 3.71 | 168437 | 220.0 |
| | | 62 | | | |
| 10 | 7.538 | 9315 | 0.51 | 22407 | 201.2 |
| | | 1 | | | |
| 11 | 10.591 | 9947 | 0.55 | 25711 | 209.4 |
| | | 2 | | | |
| 12 | 10.807 | 2285 | 12.62 | 475450 | 223.5 |
| | | 923 | | | |

Se realizó la selección de los componentes representativos en el cromatograma, la determinación de tiempo de retención y el área (Figura 17).

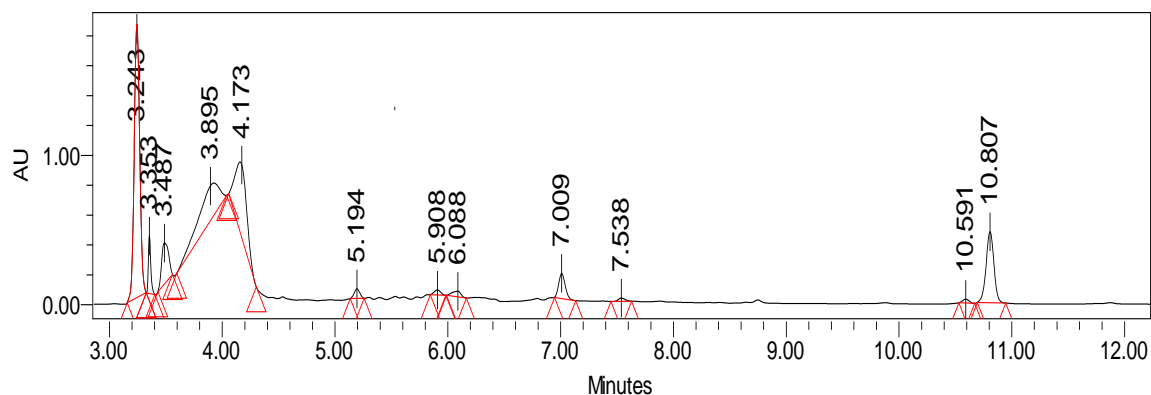
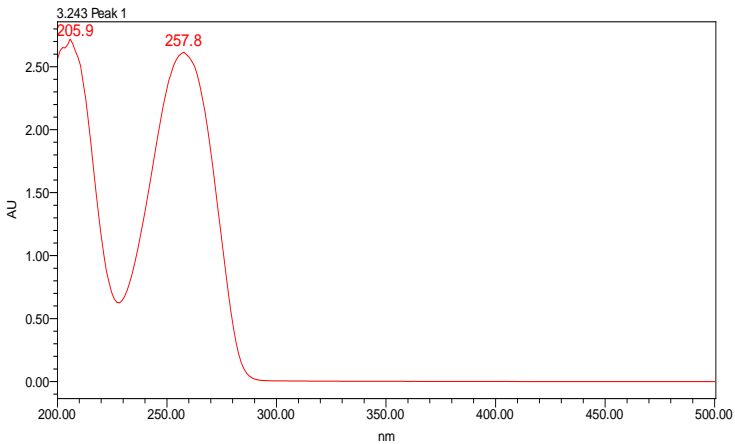
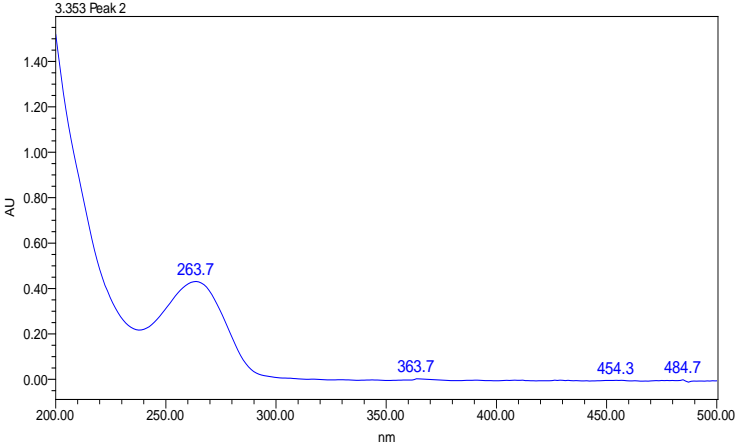
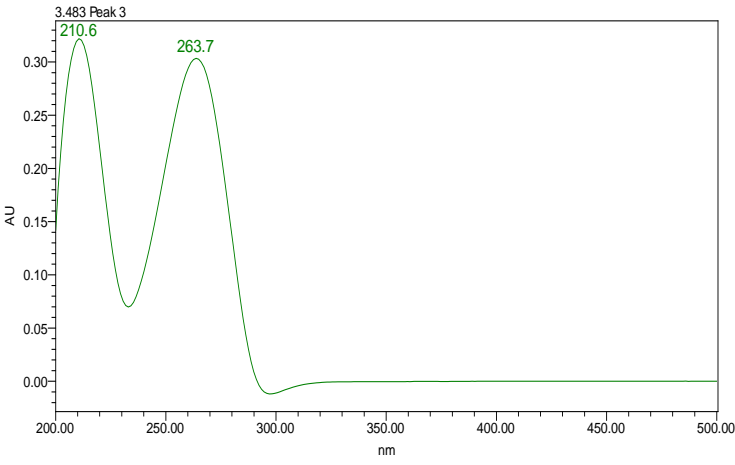
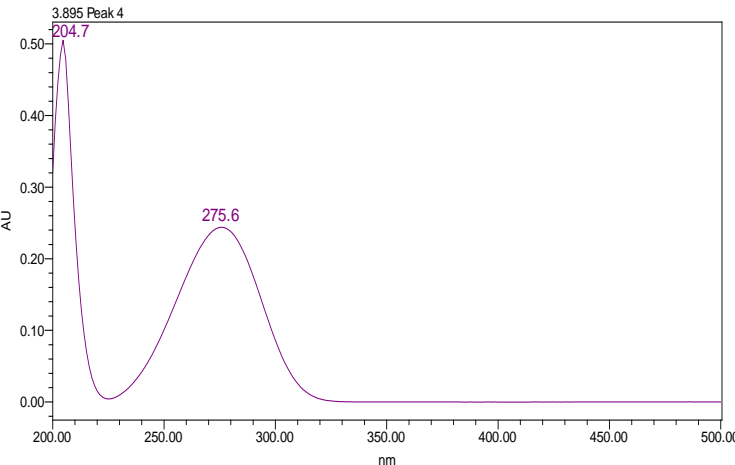
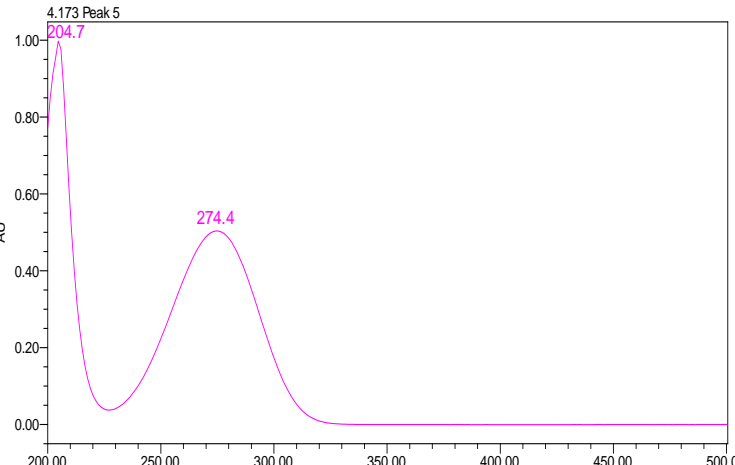
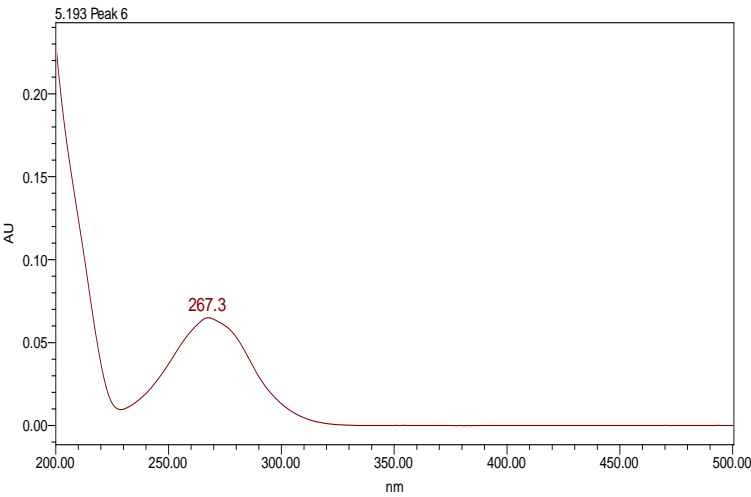
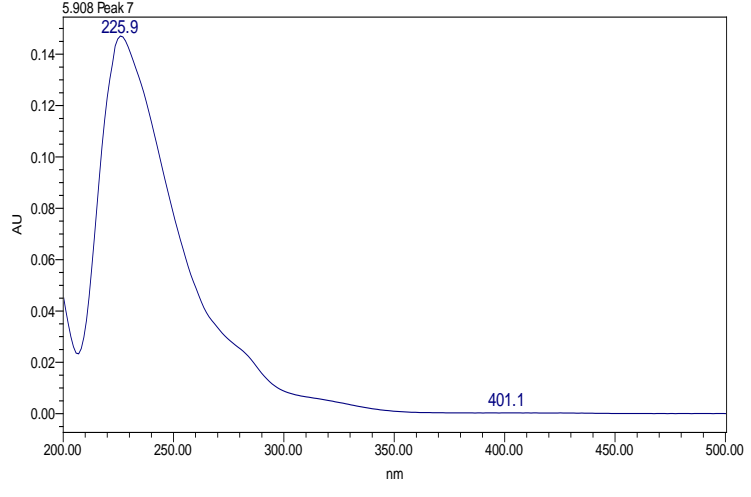


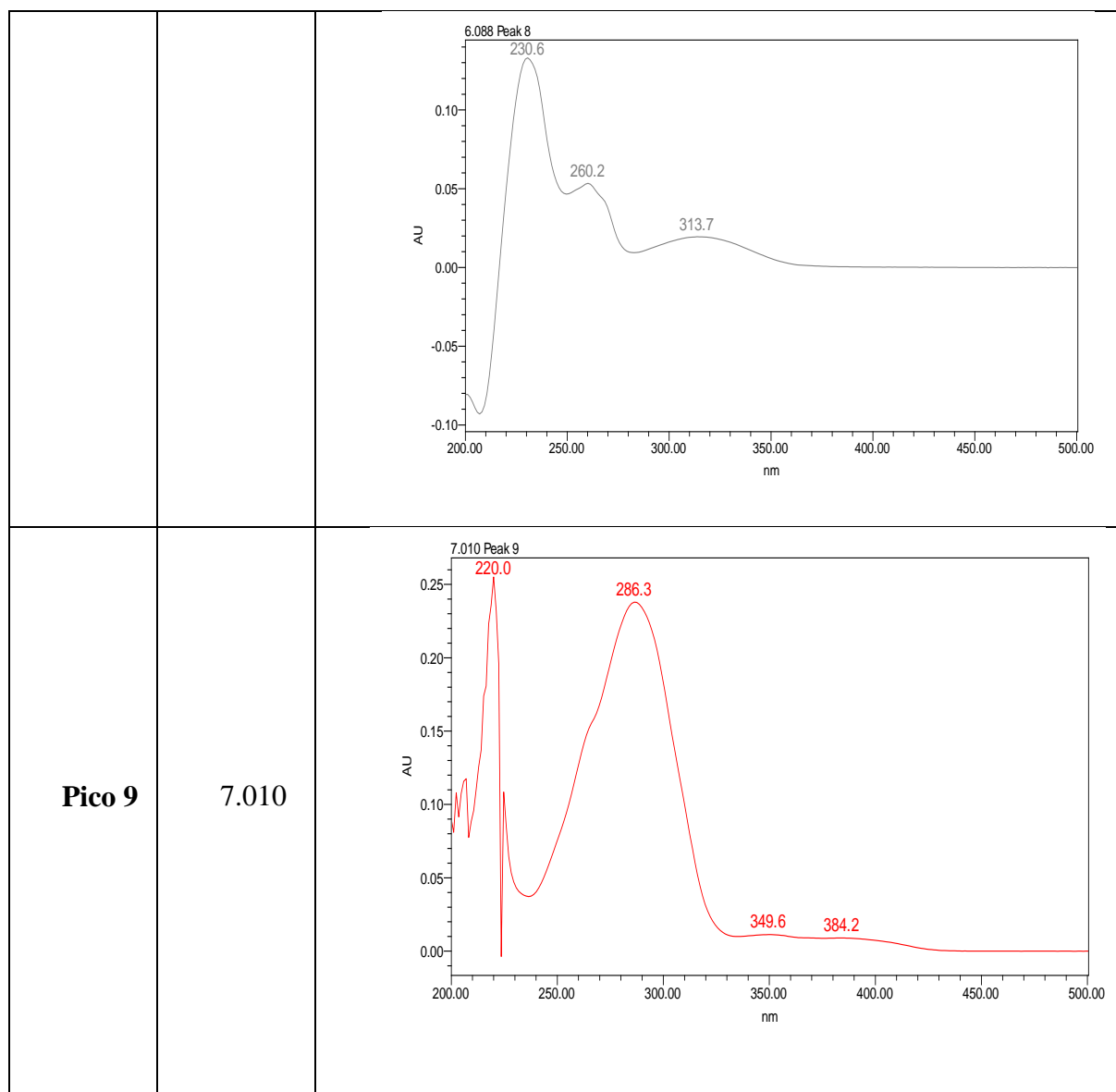
Figura 17. Cromatograma del metabolito p3772 con los componentes más representativos.

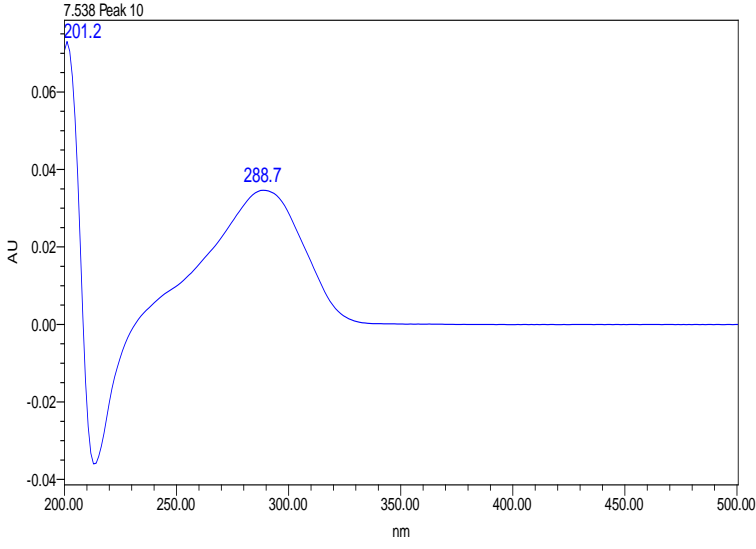
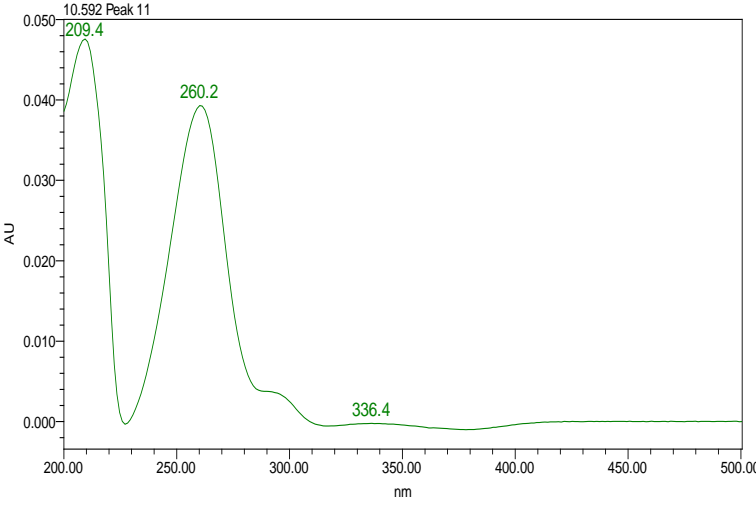
Los tiempos de retención del metabolito y del antibiótico cloranfenicol se presentaron cercanos, sin embargo, el componente no presentó altura y área similar a la presentada por el antibiótico (Figura 15). Por lo cual, se realizó el estudio de los 12 componentes representativo del metabolito en relación al espectro ultra violeta (UV) generado (Figura 18).

| <i>Espectro UV de los Componentes Representativos y Cloranfenicol</i> | | |
|---|----------------------------|--|
| Picos | Tiempo de retención | Espectro Ultra violeta |
| Pico 1 | 3.243 |  |
| Pico 2 | 3.353 |  |
| Pico 3 | 3.487 | |

| | | |
|---------------|-------|--|
| | |  <p>3.483 Peak 3</p> <p>210.6</p> <p>263.7</p> <p>AU</p> <p>nm</p> <p>Detailed description: This is a UV-Vis absorption spectrum for 'Pico 3'. The y-axis is labeled 'AU' (Absorbance Units) and ranges from 0.00 to 0.30. The x-axis is labeled 'nm' (nanometers) and ranges from 200.00 to 500.00. The spectrum shows two distinct peaks: a smaller one at 210.6 nm and a larger one at 263.7 nm. The absorbance is zero for wavelengths above 300 nm.</p> |
| Pico 4 | 3.895 |  <p>3.895 Peak 4</p> <p>204.7</p> <p>275.6</p> <p>AU</p> <p>nm</p> <p>Detailed description: This is a UV-Vis absorption spectrum for 'Pico 4'. The y-axis is labeled 'AU' and ranges from 0.00 to 0.50. The x-axis is labeled 'nm' and ranges from 200.00 to 500.00. The spectrum shows two peaks: a sharp one at 204.7 nm and a broader one at 275.6 nm. The absorbance is zero for wavelengths above 350 nm.</p> |
| Pico 5 | 4.173 |  <p>4.173 Peak 5</p> <p>204.7</p> <p>274.4</p> <p>AU</p> <p>nm</p> <p>Detailed description: This is a UV-Vis absorption spectrum for 'Pico 5'. The y-axis is labeled 'AU' and ranges from 0.00 to 1.00. The x-axis is labeled 'nm' and ranges from 200.00 to 500.00. The spectrum shows two peaks: a sharp one at 204.7 nm and a broader one at 274.4 nm. The absorbance is zero for wavelengths above 350 nm.</p> |

| | | |
|---------------|-------|---|
| Pico 6 | 5.193 |  <p>5.193 Peak 6</p> <p>AU</p> <p>0.20</p> <p>0.15</p> <p>0.10</p> <p>0.05</p> <p>0.00</p> <p>200.00 250.00 300.00 350.00 400.00 450.00 500.00</p> <p>nm</p> <p>267.3</p> <p>Detailed description: This is a line graph showing the absorption spectrum for Pico 6. The y-axis is labeled 'AU' (Absorbance Units) and ranges from 0.00 to 0.20 with major ticks every 0.05. The x-axis is labeled 'nm' (nanometers) and ranges from 200.00 to 500.00 with major ticks every 50.00. The plot shows a red curve that starts at approximately 0.22 AU at 200 nm, drops to a minimum of about 0.01 AU at 230 nm, rises to a peak of 0.07 AU at 267.3 nm, and then gradually decays to near zero by 350 nm. A red label '267.3' is placed above the peak. The title '5.193 Peak 6' is located at the top left of the plot area.</p> |
| Pico 7 | 5.908 |  <p>5.908 Peak 7</p> <p>AU</p> <p>0.14</p> <p>0.12</p> <p>0.10</p> <p>0.08</p> <p>0.06</p> <p>0.04</p> <p>0.02</p> <p>0.00</p> <p>200.00 250.00 300.00 350.00 400.00 450.00 500.00</p> <p>nm</p> <p>225.9</p> <p>401.1</p> <p>Detailed description: This is a line graph showing the absorption spectrum for Pico 7. The y-axis is labeled 'AU' and ranges from 0.00 to 0.14 with major ticks every 0.02. The x-axis is labeled 'nm' and ranges from 200.00 to 500.00 with major ticks every 50.00. The plot shows a blue curve that starts at approximately 0.02 AU at 200 nm, rises to a peak of 0.14 AU at 225.9 nm, and then decays to about 0.01 AU at 300 nm, remaining near zero until 500 nm. A blue label '225.9' is placed above the peak, and another blue label '401.1' is placed on the x-axis at 401.1 nm. The title '5.908 Peak 7' is located at the top left of the plot area.</p> |
| Pico 8 | 6.088 | |



| | | |
|--------------------|--------|--|
| Pico 10 | 7.538 |  <p>7.538 Peak 10</p> <p>201.2</p> <p>288.7</p> <p>AU</p> <p>nm</p> <p>Detailed description: This is a UV-Vis absorption spectrum for 'Pico 10'. The y-axis is labeled 'AU' (Absorbance Units) and ranges from -0.04 to 0.06. The x-axis is labeled 'nm' (nanometers) and ranges from 200.00 to 500.00. The spectrum shows a sharp peak at 201.2 nm with an absorbance of approximately 0.07. It then drops to a minimum of about -0.035 at 220 nm, followed by a broad shoulder peaking at 288.7 nm with an absorbance of about 0.035. The absorbance returns to zero by 350 nm and remains there until 500 nm.</p> |
| Pico 11 | 10.591 |  <p>10.592 Peak 11</p> <p>209.4</p> <p>260.2</p> <p>336.4</p> <p>AU</p> <p>nm</p> <p>Detailed description: This is a UV-Vis absorption spectrum for 'Pico 11'. The y-axis is labeled 'AU' and ranges from 0.000 to 0.050. The x-axis is labeled 'nm' and ranges from 200.00 to 500.00. The spectrum shows a peak at 209.4 nm with an absorbance of approximately 0.048. It then drops to a minimum of about 0.000 at 230 nm, followed by a second peak at 260.2 nm with an absorbance of about 0.038. There is a small shoulder at 336.4 nm with an absorbance of about 0.002. The absorbance returns to zero by 400 nm and remains there until 500 nm.</p> |
| Pico 12 | 10.807 | |

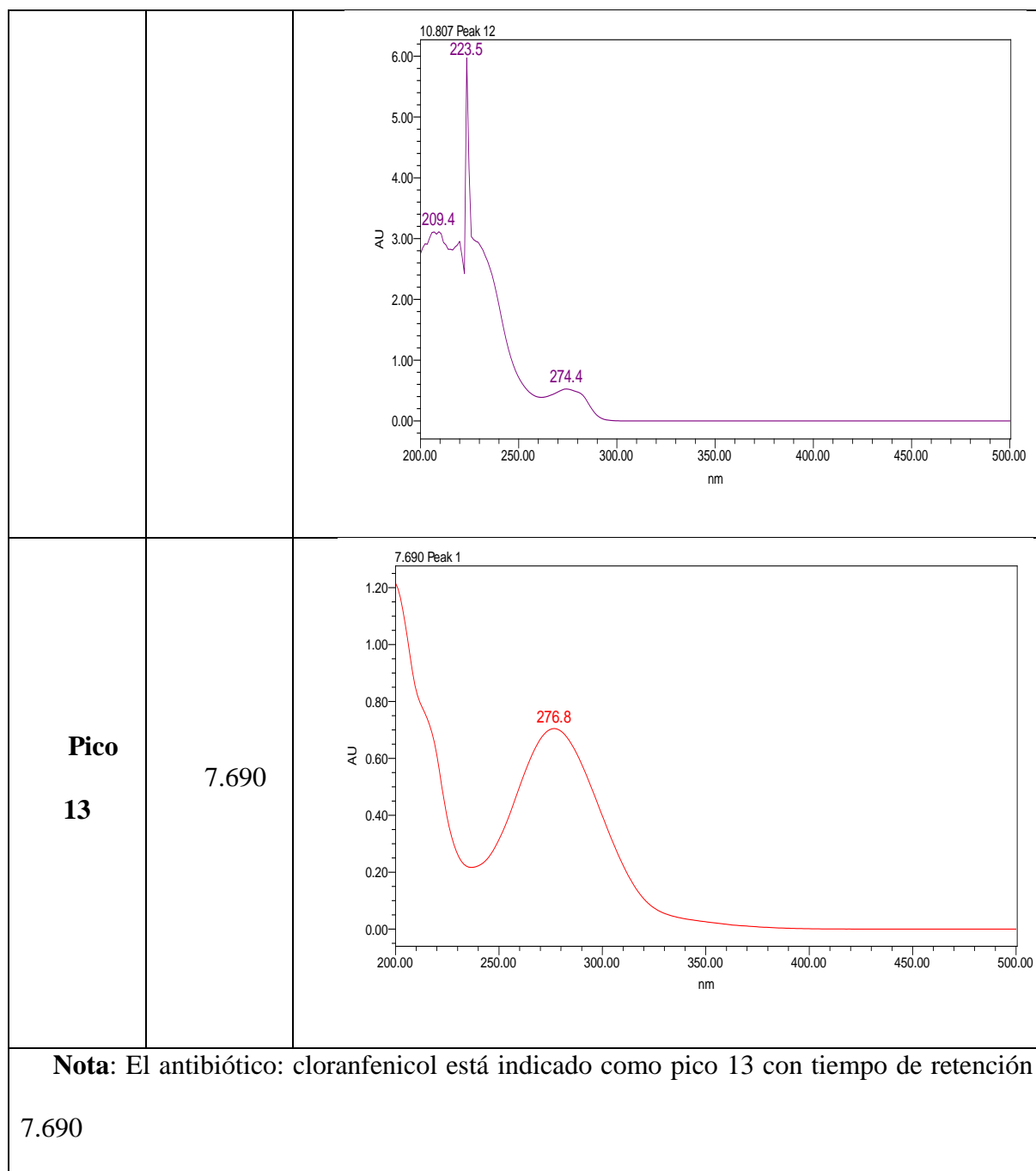


Figura 18. Espectro UV de los componentes representativos y Cloranfenicol

Los antibióticos producidos por actinomicetos se encuentran ubicados dentro de familias por presentar funciones activas similares (Tabla 2). Los espectros UV igualmente presentan homologías en su conformación, estableciendo la base para la identificación de los componentes o variantes en estas familias.

El espectro UV del cloranfenicol con absorción de onda de 276.8 (pico 13, Figura 17.) presenta similitud con los espectros obtenidos en los picos 2, 4, 5 y 6 con longitud de absorción de onda de 263.7, 275.6, 274.4 y 267.3 respectivamente, indicando una posible variante de estos componentes en la familia de los Fenicoles de la cual es miembro el Cloranfenicol (Honorio, 2009).

El comportamiento observado en los espectros UV de los picos 2 y 6 y los picos 4 y 5, revelan cercanía entre estos componentes y una posible variante en su conformación química.

Extracción de DNA y PCR 16 S RNAr

Se realizó la extracción de DNA de los 11 aislados con el protocolo Salting Out (modificado) (Figura 19).

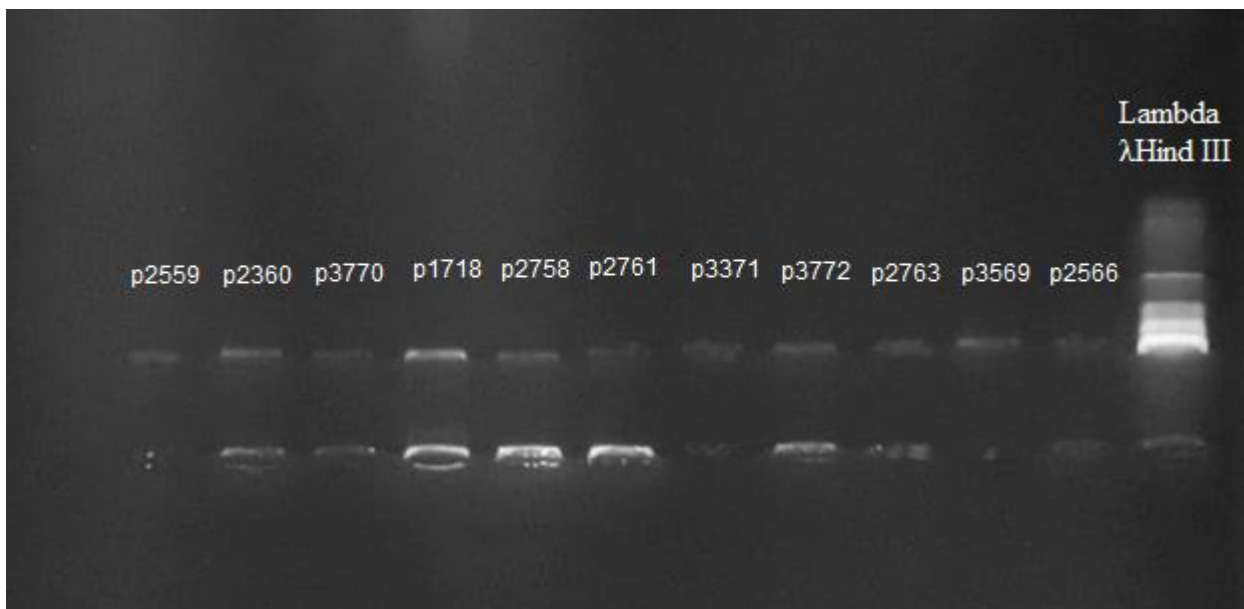


Figura 19. DNA de aislados extraído con protocolo Salting Out

Resultado PCR de la subunidad ribosomal 16 S RNA r (Figura 20).

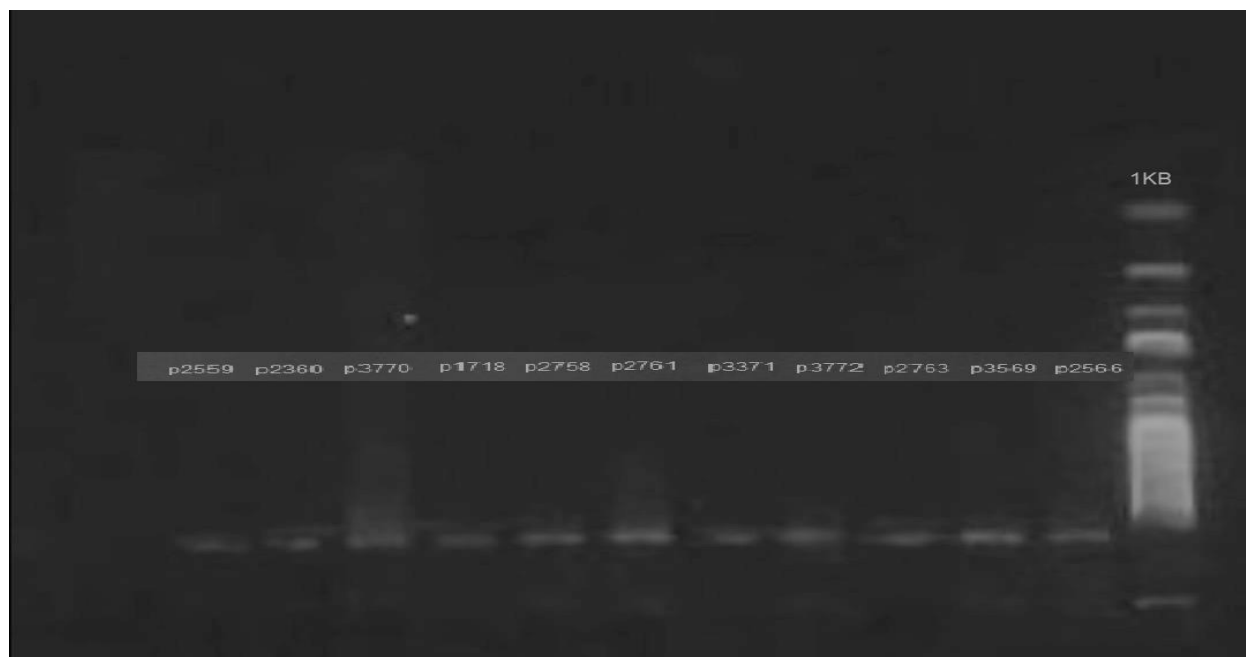


Figura 20. PCR 16 S RNAr de los aislados

CONCLUSIONES

Se realizó la extracción de metabolitos con capacidad inhibitoria de bacterias patógenas vinculadas a procesos infecciosas, generando una potencial fuente de obtención de compuestos activos que brinde solución al creciente reporte de resistencia bacteriana en Nariño y el mundo.

Los factores fisicoquímicos juegan un papel vital en el desarrollo y crecimiento de actinomicetos, la disminución en los macronutrientes y las condiciones ácidas en el suelo formaron un factor limitante en su crecimiento.

La extracción con acetato de etilo de los cultivos permitió obtener metabolitos con capacidad inhibitoria, de igual forma se confirmó que el solvente como control no tiene acción inhibitoria.

El análisis de los metabolitos por HPLC evidenció la presencia de 12 fracciones dentro del metabolito total vinculadas en los procesos de inhibición.

La evaluación por HPLC reportó la no presencia de cloranfenicol en el metabolito total del aislado p3772. Sin embargo, se realizó la observación a través de espectro UV de metabolitos pertenecientes a esta familia de antibióticos, generando una tentativa a variantes de cloranfenicol.

Las pruebas antagónicas no revelaron resultados consistentes en comparación a las realizadas con el metabolito total, posiblemente por la difusión de los componentes metabólicos a través del medio o factores de activación del metabolismo secundario.

El medio R5 de producción no permitió la diferenciación de halos de inhibición en las pruebas, producto de la rápida dispersión de los aislados en el medio, dificultando la medición.

Durante la rota evaporación se observaron fracciones de metabolitos volátiles que no fueron recuperados. Esta pérdida de componentes pudo generar una disminución en la actividad inhibitoria de los metabolitos.

Streptomyces son los mayores productores de metabolitos activos en actinomicetos, los Fenicoles se encuentran dentro de estos, confirmando así una posible variante de Cloranfenicol.

RECOMENDACIONES

Suplementar medios con los elementos y nutrientes que generaron el mayor número de aislados, puede ser la potencial solución al bajo número de colonias aisladas y una fuente de adquisición de potenciales aislados con capacidad inhibitoria.

Realizar pruebas inhibitorias con microorganismos o linajes celulares, ampliaría el espectro de actividad como por ejemplo funciones antitumorales, inmunosupresoras o antifúngicos.

Aumentar el número de solventes para extracción de metabolitos y evaluar si las colonias con baja capacidad inhibitoria presentaban otros componentes activos con diferentes polaridades.

REFERENCIAS

- Abreu O, A. C. (2011). *Tratamiento de las*. Washington, D.C: : Quinta edición.
- Agadagba, S. K. (2014). Isolation of Actinomycetes from Soil. *Journal of Microbiology Research*. 4(3), 136-140.
- Aguilera, S. &. (2000). Importancia de la protección de la materia orgánica en suelos.
- Alós, J. I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clinica*. 33(10), 692-699.
- Andersson, D. I.-S. (2016). Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug Resistance Updates*, 26, 43-57.
- Andriulo, A. E. (2017). Carbono orgánico del suelo.).
- Aponte Ubillus, J. L. (2015). Actividad antimicrobiana y sinérgica de metabolitos producidos por *Streptomyces erythrogriseus* M10-77 de origen marino. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*,, 35(1), 17-20.
- Arango, C. D. (2015). *Climatología trimestral de Colombia*. . IDEAM.
- Arasu, M. V. (2013). Antibacterial and antifungal activities of polyketide metabolite from marine *Streptomyces* sp. AP-123 and its cytotoxic effect. *Chemosphere*, 90(2), 479-487.
- Arenas, N. E. (2018). Producción pecuaria y emergencia de antibiótico resistencia en Colombia. *Revisión sistemática. Infectio*, 22(2), 110-119.
- Arguello-Navarro, A. Z.-R. (2014). Evaluación del potencial biofertilizante de bacterias diazótrofes aisladas de suelos con cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta Agronómica*, 63 (3).

- Arifuzzaman, M. K. (2010). Isolation and screening of actinomycetes from Sundarbans soil for antibacterial activity. *African Journal of Biotechnology*, 9(29), 4615-4619.
- Baltz, R. H. (2010). Streptomyces and Saccharopolyspora hosts for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 37(8), 759-772.
- Baquero F, L. V. (2015). Public health evolutionary biology of antimicrobial resistance: priorities for intervention. *Evol Appl*, 8:223–39.
- Belyagoubi, L. B.-B.-J. (2018). Antimicrobial activities of culturable microorganisms (actinomycetes and fungi) isolated from Chaabe Cave, Algeria. *International Journal of Speleology*, 47(2), 8.
- Bengtsson-Palme, J. &. (2016). Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation. *Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation*, 86, 140-149.
- Bengtsson-Palme, J. K. (2017). Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews*, 42(1), fux053.
- Bernal, M. G.-C.-S. (2015). Isolation and in vitro selection of actinomycetes strains as potential probiotics for aquaculture. *eterinary world*, 8(2), 170.
- Bonifaz Trujillo, J. A. (2012). *Micología médica básica*. Mexico: 4a. McGraw Hill.
- Cabello, F. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ Microbiol.*, 1137-44.

- Cabrera C, G. R. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. . *Colombia Médica del Valle* , 38: 149-158.
- Calderón Murillo, Á. A. (2012). La automedicación: una costumbre sin control adecuado, que atenta contra la salud y la calidad de vida de los ciudadanos.
- Calvo, J. &-M. (2007). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. . *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(1), 44-52.
- Cardona, G. I. (2005). Abundancia de actinomicetes y micorrizas arbusculares en paisajes fragmentados de la Amazonia colombiana. *Agronomía Colombiana*, 23(2), 317-326.
- Cardona, G. I.-V.-G. (2009). Comunidades de hongos actinomicetos en tres tipos de vegetación de la Amazonia colombiana: abundancia, morfotipos y el gen 16s ADNr. *Revista de biología tropica*, 57(4), 1119-1139.
- Carvalho, T. &. (2016). Evaluation of antimicrobial activity of the endophytic actinomycete R18 (6) against multiresistant Gram-negative bacteria. . *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, , 88(1), 155-163.
- Castillo R. D., I. S. (2017). Screening of polyketide genes from Brazilian Atlantic Forest soil. *Universitas Scientiarum*, 22(1), 87-96.
- Chaparro Pedraza, A. P. (2010). *Aislamiento e identificación de metabolitos producidos por la cepa nativa SGP 321 de mucor circinelloides y evaluación de su actividad antimicrobiana*. Master's thesis, Facultad de Ciencias.
- Chaudhary, H. S. (2013). Diversity and versatility of actinomycetes and its role in antibiotic production.
- CL., V. (2015). The antibiotic resistance crisis: part. *P.T.*, 40(4):277-83.

- Codazzi, A. (2001). Estudio general de suelos y zonificación de tierras. Departamento de Nariño. Instituto Geográfico Agustín Codazzi, Colombia. *Instituto Geográfico Agustín Codazzi, Colombia*.
- Cordiés L, M. A. (1998). Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta Médica Cubana* , 8(1):18-20.
- Cornell, C. R. (2018). Molecular Characterization of Plasmids Harbored by Actinomycetes Isolated From the Great Salt Plains of Oklahoma Using PFGE and Next Generation Whole Genome Sequencing. *Frontiers in microbiology*, 9.
- Cruz, C. L. (2018). Características epidemiológicas de la infección por Staphylococcus aureus meticilino resistente en el Hospital Clínico Regional de Valdivia. *Cuadernos de cirugía*, 14(1), 18-22.).
- Delgado, G. R. (2015). EL ANÁLISIS DEL SUELO Muestreo, Análisis e Interpretación. *Editorial Universitaria*.
- Doroghazi, J. R. (2013). Comparative genomics of actinomycetes with a focus on natural product biosynthetic genes. *BMC genomics*, 14(1), 611.
- Du L, S. C. (2001). Hybrid Peptide–Polyketide Natural Products: Biosynthesis and Prospects toward Engineering Novel Molecules. . *Metab Eng*, 3: 78-95.
- Durrer, A. G. (2017). The drivers underlying biogeographical patterns of bacterial communities in soils under sugarcane cultivation. *Applied Soil Ecology*, 110, 12-20.
- Egas Rosero, C. I. (2016). Aislamiento de microorganismos capaces de producir antibióticos, a partir de suelos de las regiones naturales de Ecuador.
- Elliot, T. (1999). Antibacterial resistance in the intensive care unit. Mechanisms and management. *Br Med Bull*, 55(1):259-76.

- Evangelista-Martínez, Z. &.-E. (2007). Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos. , . *Revista BioTecnología* , 11, 37-50.
- Fernández F, L. J. (2003). Resistencia Bacteriana. *Revista Cubana de Medicina*.
- Ferrer, R. I.-L. (2014). Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and. *Crit. Care Med.*, 42, 1749–1755.
- Fischbach, M. A. (2006). Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. . *Chemical reviews*, 106(8), 3468-3496.
- Floros, D. J. (2016). A metabolomics guided exploration of marine natural product chemical space. *Metabolomics*, 12(9), 145.
- Fonseca Ardila, Y. A. (2011). Efecto antagónico in vitro de actinomicetos aislados de purines de chipaca (*Bidens pilosa* L.) frente a *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. . *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 64(2), 6111-6119.
- Foxman, B. (2002). Epidemiology of urinary tract infections: Incidence, morbidity, and economic costs. *Am J Med*.
- Foxman, B. (2002). Epidemiology of urinary tract infections: Incidence, morbidity, and economic costs. *Am J Med.*, 113.
- Frade, M. T. (2018). Epidemiological, clinical, pathological and morphotinctorial features of fourteen cases of nocardiosis in dogs. *Pesquisa Veterinária Brasileira*,, 38(1), 99-106.
- Fridkin, S. J. (2014). Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Vital signs: Improving antibiotic use among hospitalized patients. *Morb. Mortal.*, 63, 194–200.
- Galán Montemayor, J. C. (2014). Impacto de los movimientos migratorios en la resistencia bacteriana a los antibióticos. *Revista Española de Salud Pública*, 88, 829-837.

- Ganesan, P. R.-D. (2017). Antimicrobial activity of some actinomycetes from Western Ghats of Tamil Nadu, India. . *Alexandria journal of medicine*, 53(2), 101-110.
- García, S. C. (2011). Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. (3), 173-186.
- Garrido, L. M.-e.-A. (2006). Insights in the glycosylation steps during biosynthesis of the antitumor anthracycline cosmomycin: characterization of two glycosyltransferase genes. *Applied microbiology and biotechnology*, 73(1), 122-131.
- Garrity, M. G. (2001). Manual of systematic bacteriology.
- Gebreyohannes, G. M. (2013). Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. *Asian pacific journal of Tropical biomedicine*, 3(6), 426-435.
- Ghorbani-Nasrabadi, R. G. (2013). Distribution of actinomycetes in different soil ecosystems and effect of media composition on extracellular phosphatase activity. *Journal of soil science and plant nutrition*, 13(1), 223-236.
- Gómez Giraldo, J. C. (2013). Manual de prácticas de campo y del laboratorio de suelos.
- Griffin, D. W. (2007). Atmospheric movement of microorganisms in clouds of desert dust and implications for human health. . *Clinical microbiology reviews*,, 20(3), 459-477.
- Guerrero, D. L. (2019). *Determinación de la resistencia a antibioticos de Escherichia coli aislada de ambiente clinico de la ciudad de San Juan de Pasto*. San Juan de Pasto.
- Guevara, L. &. (2017). Aislamiento y caracterización morfológica de cepas nativas de actinomicetos y su actividad antagónica contra *Ralstonia solanacearum*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* sp.

- Guilhelmelli, F. V.-P. (2013). Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Frontiers in microbiology*, 4, 353.
- Hertweck. (2009). The Biosynthetic Logic of Polyketide Diversity. *Angew Chem Int Ed. Engl*, 48, 4688-4716.
- Honorio, A. &. (2009). Control de calidad de formas farmacéuticas realizado en el laboratorio de control de calidad hypatia sa.
- Hussaini, S. Z. (2017). Studies on Antimicrobial Activity of Fresh Water Actinomycetes against Gram Negative Bacteria.
- Jalali, H. K. (2016). Antagonistic activity of *Nocardia brasiliensis* PTCC 1422 against isolated Enterobacteriaceae from urinary tract infections. *Probiotics and antimicrobial proteins*, , 8(1), 41-45.
- Jiménez, G. &. (2010). *Los actinomicetos: una visión como promotores de crecimiento vegetal*. Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias.
- Khucharoenphaisan K, S. N. (2012). Isolation and identification of actinomycetes from termite's gut against human pathogen. *Asian J Anim Vet Adv*, 7:68–73.
- Kieser, T. B. (2000). *Practical streptomyces genetics*. Norwich: : John Innes Foundation (Vol. 291). .
- Kumari, K. S. (2017). Isolation of Antibiotic Producing Actinomycetes from Untapped Soils of Yarada Hills And Assessment of their Antimicrobial Activities.
- Lamilla, C. B. (2018). *Streptomyces luridus* So3. 2 from Antarctic soil as a novel producer of compounds with bioemulsification potential. *PloS one*, 13(4), e0196054.

- Lancini GC, P. F. (1995). *Antibiotics: A Multidisciplinary Approach*. Plenum Press New York, NY.
- León, J. A. (2019). Estudio de actinomicetos marinos aislados de la costa central del Perú y su actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistentes y *Enterococcus faecalis* Vancomicina Resistentes. . *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 28(2), 237-246.
- Levin-Reisman, I. R. (2017). Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. *Science*, 355(6327), 826-830.
- Liu, C. J. (2017). Diversity, Antimicrobial Activity, and Biosynthetic Potential of Cultivable Actinomycetes Associated with Lichen Symbiosis. *Microbial ecology*, 74(3), 570-584.
- Llambías Wolff, J. (2003). Los desafíos inconclusos de la salud y las reflexiones para el futuro en un mundo globalizado. *Revista Cubana de Salud Pública*, 29(3), 236-245.
- Lozano, R. N. (2012). Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The lancet*.
- Malagón, D. P. (1995). Suelos de Colombia. Origen, Evolución, Clasificación, Distribución y uso. Bogotá. *Instituto Geográfico Agustín Codazzi. Subdirección de Agrología*.
- Maldonado Cepeda, D. L. (2010). Determinación de metabolitos secundarios a partir de la cepa nativa cv15nd aislada del Páramo Cruz Verde, departamento de Cundinamarca. *Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias*.
- Marston, H. D. (2016). Resistencia antimicrobiana. *JAMA*, 316(11), 1193-204.
- Martínez-Trujillo, M. A.-R. (2012). Revisión: Aplicaciones ambientales de microorganismos inmovilizados. *Revista mexicana de ingeniería química*, 11(1), 55-73.

- Mensa, J. B. (2018). Antibiotic selection in the treatment of acute invasive infections by *Pseudomonas aeruginosa*: Guidelines by the Spanish Society of Chemotherapy. *Revista Española de Quimioterapia*, 31(1), 78.
- Mohr, K. (2016). History of Antibiotics Research. . *Curr Top Microbiol Immunol.*, 398:237-272.
- Moreno C, G. R. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. . *Revista Otorrinolaringología Cirugía Cabeza y Cuello*, 69: 185-192.
- Muthu, M. R. (2013). Isolation and identification of Actinomycetes *Isotericola variabilis* from Cauvery River soil sample. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 2(6), 236-245.
- Nafis, A. E. (2017). Research of Secondary Metabolites with Non-polyenic Antifungal Activity Produced by Actinomycetes Isolated from Different Moroccan Habitats. *Conference for Environmental Integration* , (págs. 1237-1238). Springer, Cham.
- Najafpour, R. (2007). Biochemical Engineering and Biotechnology. *Elsevier*.
- Niu, G. (2017). Genomics-Driven Natural Product Discovery in Actinomycetes. *Trends in biotechnology*.
- OMS. (2017). La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. *Organización mundial de la salud.*, págs. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/>.
- Oteo, J. C.-B.-G. (2014). La amenaza de las enterobacterias productoras de carbapenemasas en España: documento de posicionamiento de los grupos de estudio GEIH y GEMARA de la SEIMC. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(10), 666-670.
- Ovejero, C. M. (2017). Mecanismos emergentes de resistencia a antibióticos en enterobacterias de origen humano, animal y ambiental . *Universidad Complutense de Madrid*.
- Pagalilauan GL, L. A. (2013). Infections in transplant patients. *Med Clin North Am*.

- Palmero, D. (2016). Novedades en tuberculosis multirresistente. . *Revista americana de medicina respiratoria*, 16(3), 203-205.
- Pandey, A. A. (2011). Isolation and characterization of actinomycetes from soil and evaluation of antibacterial activities of actinomycetes against pathogens.
- Parada, R. B. (2017). Aislamiento y caracterización parcial de actinomicetos de suelos con actividad antimicrobiana contra bacterias multidrogo-resistentes. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(2), 17-23.
- Patiño, C. A. (2007). Aislamiento de bacterias lipolíticas y determinación de patógenos humano escherichia coli y salmonella sp. a partir de residuos orgánicos domiciliarios en compostaje.
- Paul, E. A. (2014). Soil microbiology, ecology and biochemistry. *Academic press*.
- Pereira, A. L. (2018). Alexander Fleming (1881-1955): da descoberta da penicilina (1928) ao prémio Nobel (1945). *História: revista da Faculdade de Letras da Universidade do Porto*, 6.
- Pérez-Rojas, F. L.-Q.-C. (2015). Actinomicetos aislados del compost y su actividad antagonista a fitopatógenos de la papa (*Solanum tuberosum* spp. andigena Hawkes),. *Revista mexicana de fitopatología*, 33(2), 116-139.
- Prevention, C. f. (2013). Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. *Centres for Disease Control and Prevention, US Department of Health and Human Services*.
- Priyadharsini, P. &. (2015). Diversity of soil allelopathic Actinobacteria in Tiruchirappalli district, Tamilnadu, India. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 14(1), 54-60.

- Pruden A, L. D. (2013). Management Options for Reducing the Release of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes to the Environment. *Environ Health Perspect.*, 121(8):878-84.
- Quiñones-Aguilar, E. E.-M.-E. (2016). Los actinomicetos y su aplicación biotecnológica.
- Ramírez, P. &. (2003). Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. *Revista Peruana de Biología*, 10(1), 67-77.
- Ramos Vásquez, E. &. (2008). Efecto de la humedad, temperatura y pH del suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio. *Ecología aplicada*, 7(1-2), 123-130.
- Rasool, U. &. (2017). Marine endophytic actinomycetes assisted synthesis of copper nanoparticles (CuNPs): Characterization and antibacterial efficacy against human pathogens. *Materials Letters*, 194, 176-180.
- Rimando, B. S. (2007). *Aplethora of ployketides: Structures, Biological Activities and Enzymes*. 955, 2-14: ACS Symp.
- Rodrigues, J. P. (2018). Characterization and mapping of secondary metabolites of *Streptomyces* sp. from caatinga by desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI-MS). *Analytical and bioanalytical chemistry*, ., 410(27), 7135-7144.
- Rojas, J. J. (2005). Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 4-2.
- Romero, J. P. (2014). Sobre la resistencia bacteriana hacia antibióticos de acción bactericida y bacteriostática. *Revista Integración*, 32(1), 101-116.

- Rueda C., A. M. (2009). Evaluación de la presencia del gen mer A implicado en la detoxificación de mercurio a partir de actinomicetos nativos del humedal de La Conejera. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 105-113.
- Santamarina, J. C. (2008). Clasificación de suelos: fundamento físico, prácticas actuales y recomendaciones. *Georgia Institute of Technology*,, 790.
- Santana, M. D. (2017). *Diversidad de genes policetido sintasas tipo I en un metagenoma de agua subterránea del acuífero de Yucatan*. Merida, Yucatan: Biotecnología.
- Sanz. (2005). Aislamiento y caracterización de genes de la ruta biosintética de un antifúngico oxopentaeno producido por *Streptomyces* sp. *Centro nacional de Biotecnología*, 53-55.
- Saxena, A. K. (2018). *Communicable Diseases of the Developing World*. Springer.
- Schaetzl, R. J. (2015). *Soils*. Cambridge university press.
- Shah, A. M. (2017). Antimicrobial investigation of selected soil actinomycetes isolated from unexplored regions of Kashmir Himalayas,. *India. Microbial pathogenesis*, 110, 93-99.
- Sharma, M. (2014). Actinomycetes: source, identification, and their applications. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 3(2), 801-32.
- Silini, S. A.-K. (2016). Isolation and preliminary identification of actinomycetes isolated from a wastewater treatment plant and capable of growing on methyl ethyl ketone as a sole source of carbon and energy. *Desalination and Water Treatment*, 57(26), 12108-12117.
- Sivick KE, M. H. (2010). Waging war against uropathogenic *Escherichia coli*: Winning back the urinary tract. *Infect Immun.* , 78:568–85.
- Sivick KE, M. H. (2010). Waging war against uropathogenic *Escherichia coli*: Winning back the urinary tract. *Infect Immun*, 78:568–85.

- Sivila de Cary, R. &. (2006). Efecto del descanso agrícola sobre la microbiota del suelo (Patarani- Altiplano Central boliviano). . *Ecología en Bolivia*, 41(3), 103-115.
- Solanki R, K. M. (2008). Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian J Microbiol.*, 48:410-31.
- Staunton, J. &. (2001). Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Natural product reports*, 18(4), 380-416.
- Sugiyama, M. (2015). Structural biological study of self-resistance determinants in antibiotic-producing actinomycetes. *The Journal of antibiotics*, 68(9), 543.
- Tacconelli, E. C. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), 318-327.
- Tomás, R. C. (2012). Implementación de un laboratorio virtual de Mecánica de Suelos y Rocas. 7-8.
- Tomás, R. C.-B. (2012). *Implementación de un laboratorio virtual de Mecánica de Suelos y Rocas*. 7-8: X jornadas de redes de investigación en docencia universitaria.
- Tuomela, M. V. (2000). Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology*, 72(2), 169-183.
- USDA. (1999). Guía para la Evaluación de la Calidad de Suelo. *Instituto de Calidad*, Servicio de.
- Usha, R. J. (2011). Antagonistic activity of actinomycetes isolates against human pathogen. *J Microbiol Biotechnol Res.*, 1, 74-79.
- Uzcátegui Negrón, M. D. (2013). Condiciones de cultivo que fomentan la producción de sustancias antimicrobianas en actinomicetos patógenos y del suelo. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 33(2), 134-139.

- Uzcátegui-Negrón, M. S.-N. (2009). Clasificación e identificación de especies de actinomicetos: Un estudio fenotípico comparativo. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(2), 91-97.
- Villalobo Polo, E. (2019). Alexander Fleming: 70 años de su visita a España.
- Villanueva, L. &. (2011). Selección de *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. y actinomicetos productores de Ácido Indol Acético (AIA) aislados de “Biol” de elaboración artesanal provenientes de Lima y Huancayo.
- Waksman, S. A. (1940). On the classification of actinomycetes. *Journal of bacteriology*, 39(5), 549.
- Yanez, J. M. (2011). *Las enfermedades infecciosas en la historia humana*. LibrosEnRed.