

Información Importante

La Universidad de La Sabana informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del Catálogo en línea de la Biblioteca y el Repositorio Institucional en la página Web de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad de La Sabana.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento para todos los usos que tengan finalidad académica, nunca para usos comerciales, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le de crédito al documento y a su autor.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, La Universidad de La Sabana informa que los derechos sobre los documentos son propiedad de los autores y tienen sobre su obra, entre otros, los derechos morales a que hacen referencia los mencionados artículos.

BIBLIOTECA OCTAVIO ARIZMENDI POSADA
UNIVERSIDAD DE LA SABANA
Chía - Cundinamarca

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL Y
ANTIFÚNGICA DE ACTINOBACTERIAS CULTIVABLES
AISLADAS DE LAS RIBERAS DEL RÍO GUAVIARE**

NATALIA PASTRANA CAMACHO



Universidad de
La Sabana

**UNIVERSIDAD DE LA SABANA
FACULTAD DE INGENIERÍA
MAESTRÍA EN DISEÑO Y GESTIÓN DE PROCESOS
2015**

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL Y ANTIFÚNGICA DE ACTINOBACTERIAS CULTIVABLES AISLADAS DE LAS RIBERAS DEL RÍO GUAVIARE

NATALIA PASTRANA CAMACHO

**Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Diseño y Gestión de Procesos con énfasis en Bioprocesos**

DIRECTORES:

Dr. LUIS EDUARDO DÍAZ

Dra. ZULMA ROCIO SUAREZ

Asesor: Dr. Alejandro Acosta González

**UNIVERSIDAD DE LA SABANA
FACULTAD DE INGENIERÍA
MAESTRÍA EN DISEÑO Y GESTIÓN DE PROCESOS
2015**

***“Una búsqueda comienza siempre con la
suerte del principiante y termina con la
prueba del conquistador”
Paulo Coelho***

Agradecimientos

Agradezco a Dios por permitirme vivir una experiencia académica más, disfrutarla y sobretodo adquirir nuevos conocimientos.

A mis papas, Esperanza y Miguel por ser mi apoyo y enseñarme a ser una persona disciplinada y comprometida.

A Diego por su incondicional ayuda y apoyo, por sus consejos, pero sobretodo por su constante motivación en momentos de dificultad.

A la Universidad de La Sabana y profesores quienes me permitieron culminar con éxito esta nueva etapa en mi vida. Un agradecimiento especial a la profesora Ligia Sánchez por ser la primera persona en introducirme al mundo de los microorganismos y guiarme en la fase inicial del proyecto.

A mis directores, Dr. Luis Eduardo Díaz y Dra. Zulma Suárez por toda su colaboración y dedicación durante el desarrollo del proyecto, por su paciencia y enormes enseñanzas, pero sobretodo por su exigencia que me motiva a hacer las cosas cada día mejor. Quiero también agradecer al Dr. Alejandro Acosta por sus valiosos consejos académicos y su enorme ayuda en la identificación molecular de las *Actinobacterias*.

A mis amigos del laboratorio, en especial a Lina quien me enseñó y me colaboró muchísimo con la manipulación de las bacterias; a Carolina por todo su apoyo y ayuda y a todas las demás personas que hicieron de mi estancia en el laboratorio de microbiología una experiencia muy amena y enriquecedora.

A Jorge por su gran ayuda en el laboratorio de biológica molecular y a Pili por toda su colaboración.

Tabla de Contenido

Resumen	9
1. Introducción	11
2. Marco Teórico	13
2.1. Características de las actinobacterias	13
2.2. Importancia de las actinobacterias como fuente de compuestos antimicrobianos..	14
2.3. Hábitat	21
2.3.1. Estudios de actinobacterias en fuentes acuáticas de agua dulce.....	21
2.3.2. Estudios de actinobacterias en Colombia	23
2.4. Ambiente de estudio: Río Guaviare.....	24
3. Objetivos	26
3.1. Objetivo general.....	26
3.2. Objetivos específicos.....	26
4. Metodología	27
4.1. Recolección de muestras	28
4.2. Aislamiento de los microorganismos	29
4.2.1. Siembra directa.....	29
4.2.2. Enriquecimiento con carbonato de calcio.....	29
4.2.3. Método de calentamiento	29
4.3. Aislamiento en cultivo puro y selección de cepas	29
4.4. Ensayos preliminares de actividad antimicrobiana.....	30
4.4.1. Microorganismos evaluados	30
4.4.2. Evaluación de la actividad antibacterial de las cepas	30
4.4.3. Cultivo de actinobacterias en medio líquido	31
4.4.4. Evaluación de la actividad antifúngica de las cepas	31
4.5. Observaciones morfológicas y bioquímicas de las cepas seleccionadas	32
4.5.1. Características morfológicas	32
4.5.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	32
4.5.3. Estudio de consumo de fuentes de carbono	32
4.6. Determinación de sensibilidad y resistencia antibiótica	33
4.7. Identificación molecular de las cepas seleccionadas	34
4.7.1. Extracción de ADN	34
4.7.2. Secuenciación del gen16S rRNA	34

4.7.3. Análisis de las secuencias.....	35
4.8. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las cepas seleccionadas.....	35
4.8.1. Cultivo de actinobacterias en medio líquido y extracción con disolvente.....	35
4.8.2. Ensayos actividad antimicrobiana	35
5. Resultados y discusión	37
5.1. Aislamiento de actinobacterias y efecto del pre-tratamiento	37
5.2. Resultados preliminares de la actividad antimicrobiana mediante enfrentamiento directo	42
5.3. Características morfológicas y bioquímicas de las cepas seleccionadas	47
5.4. Identificación molecular de las cepas seleccionadas	52
5.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las cepas seleccionadas.....	57
6. Conclusiones y recomendaciones	62
6.1. Conclusiones	62
6.2. Recomendaciones	63
7. Bibliografía	64
8. Anexos.....	A1
8.1. Medios de cultivo	A1
8.2. Grupos de similitud con base en la morfología de los aislamientos	A2
8.3. Resultados de actividad antimicrobiana de las cepas aisladas mediante enfrentamiento directo	A4
8.4. Tinción de Gram de las cepas seleccionadas	A13
8.5. Fotografías SEM de las cepas seleccionadas	A14
8.6. Observaciones morfológicas en diferentes medios de cultivo de las cepas seleccionadas	A15
8.7. Estudio de consumo de fuentes de carbono de las cepas seleccionadas.....	A22
8.8. Resistencia y sensibilidad antibiótica.....	A23
8.9. Resultados actividad antimicrobiana de las cepas seleccionadas	A24

Lista de figuras

Figura 1: ciclo de vida de <i>Streptomyces coelicolor</i>	14
Figura 2: esquema de metodología general seguida para el desarrollo del proyecto	27
Figura 3: sitios de recolección de muestras de agua y sedimento en las riberas del río Guaviare	28
Figura 4: esquema seguido para la realización del ensayo antibacterial por enfrentamiento directo	31
Figura 5: esquema estudio de consumo de fuentes de carbono.....	33
Figura 6: proporción de cepas de actinobacterias aisladas mediante siembra directa y tratamiento con CaCO ₃	39
Figura 7: aislamiento secuencial de la cepa 3A-80 provenientes de muestras sin ningún tratamiento en medio de cultivo ISP3	40
Figura 8: fotografías de algunas de las cepas aisladas mediante siembra directa y enriquecimiento con CaCO ₃	40
Figura 9: Tinción de Gram de algunas de las cepas aisladas y observadas en el objetivo de 100x	41
Figura 10: amplificación por PCR de la región 16S rRNA de las 8 cepas.....	53
Figura 11: árbol filogenético de las cepas seleccionadas usando como estrategia de agrupamiento Máxima Parsimonia	54

Lista de tablas

Tabla 1: perfil de resistencia en Gram negativos en los servicios de hospitalización adultos en Colombia. GREBO 2013	16
Tabla 2: perfil de resistencia en Gram positivos en los servicios de hospitalización adultos. GREBO 2013.....	17
Tabla 3: Clasificación de los principales antibióticos producidos por actinobacterias según la estructura química	19
Tabla 4: estudios de actinobacterias con actividad antimicrobiana en ambientes de agua dulce	22
Tabla 5: sitios de recolección de muestras en las riberas del río Guaviare	28
Tabla 6: características morfológicas de las cepas seleccionadas observadas en el medio ISP3	48
Tabla 7: coloración de las cepas seleccionadas en los medios de cultivo ISP1, ISP2 e ISP3, vistas superiores y posteriores	49
Tabla 8: coloración de las cepas seleccionadas en los medios de cultivo ACA, ISP4 e ISP5, vistas superiores y posteriores	49
Tabla 9: resultados de perfil de fuentes de carbono asimilados por cepas seleccionadas	51
Tabla 10: resultados de resistencia antibiótica para las cepas seleccionadas	52
Tabla 11: identificación molecular de las cepas seleccionadas mediante secuenciación del gen 16S rRNA	53
Tabla 12: resultados de actividad antimicrobiana para las 7 cepas seleccionadas	58

Resumen

Las actinobacterias son bacterias Gram positivas, conocidas por ser las responsables de la producción de la mayoría de metabolitos secundarios bioactivos, especialmente aquellas pertenecientes al género *Streptomyces*, del cual se han obtenido la mayoría de antibióticos comerciales. Dado las recientes investigaciones en el medio acuático que demuestran el potencial bioactivo por parte de estos microorganismos, el presente trabajo se enfocó en la evaluación de la actividad antibacterial y antifúngica de actinobacterias aisladas de agua y sedimentos provenientes del río Guaviare. Las metodologías de tratamiento térmico, enriquecimiento con carbonato de calcio y siembra directa sobre medios de cultivo selectivos fueron utilizadas para el aislamiento de las cepas, donde el enriquecimiento con carbonato de calcio resultó ser el mejor método de aislamiento de actinobacterias, en contraste al tratamiento térmico. Se aislaron 374 bacterias con características morfológicas de actinobacterias en su mayoría provenientes de muestras de sedimentos, a las cuales se les realizó tinción de Gram para corroborar su carácter Gram positivo, pureza y morfología. Una vez purificados, todos los aislamientos fueron conservados en glicerol a -70 °C y sometidos a pruebas de enfrentamiento directo contra bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos. En total, de los 374 aislamientos 44 cepas inhibieron el crecimiento de *B. subtilis*, 36 de *S. aureus*, 15 de *E. coli*, 10 de *A. baumannii* y 2 de *K. pneumoniae*, además 257 presentaron inhibición de *quorum sensing* al ser evaluadas contra *C. violaceum*. En cuanto a la actividad antifúngica 76 de los aislamientos inhibieron el crecimiento de *T. harzianum*, 91 de *Fusarium* sp. y 150 de *C. gloeosporioides*.

Con base a los resultados iniciales de actividad antimicrobiana, fueron seleccionadas las cepas que presentaron mayor potencial antimicrobiano. Posteriormente, las 7 cepas fueron observadas en el microscopio electrónico de barrido y sometidas a pruebas de actividad antimicrobiana mediante difusión en agar. También se evaluó su crecimiento en diferentes medios de cultivo, así como su capacidad de asimilar distintas fuentes de carbono y su resistencia a diversos antibióticos. Los ensayos de actividad antimicrobiana mediante difusión en agar fueron realizados con los sobrenadantes y extractos de acetato de etilo de los caldos de fermentación de cada una de las cepas; sin embargo, no se obtuvieron los mismos resultados en comparación con la prueba de enfrentamiento directo. Finalmente, las cepas fueron identificadas molecularmente mediante la

secuenciación del gen 16S rRNA, donde se encontró que todas ellas pertenecen a la familia *Streptomycetaceae*. Los resultados obtenidos indican que los sedimentos del río Guaviare son una fuente de *Actinobacterias* con capacidad de producción de metabolitos secundarios antimicrobianos, los cuales pueden ser objeto de futuras investigaciones con posibles aplicaciones de importancia farmacéutica y agroindustrial.

Palabras claves: *Actinobacterias*, actividad antimicrobiana, *Streptomycetaceae*, metabolitos secundarios.

1. Introducción

Debido al creciente desarrollo de resistencia antibiótica por microorganismos patógenos y a la toxicidad de algunos antibióticos usados en la actualidad, se hace necesario el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos (León *et al.*, 2007). Las *Actinobacterias*, especialmente las especies del género *Streptomyces*, son los mayores productores de antibióticos, lo que se refleja en la utilización de 150 medicamentos provenientes de estas bacterias en tratamientos humanos, representando alrededor del 70% de los compuestos naturales derivados que están actualmente en uso clínico (Berdy, 2005, Manivasagan *et al.*, 2014). El estudio de actinobacterias representa entonces una alternativa en la búsqueda de nuevas sustancias que eventualmente puedan aportar a solucionar esta problemática.

Las actinobacterias son bacterias filamentosas que hacen parte de la microbiota de la mayoría de ambientes naturales, incluyendo ambientes acuáticos y terrestres, donde los suelos han sido la principal fuente de estudio de estos microorganismos (Strzelczyk *et al.*, 1969). No obstante, los hábitats de agua dulce han sido reportados como fuentes promisorias de actinobacterias con potencial bioactividad, siendo los géneros *Streptomyces* y *Micromonospora* los más abundantes en los ecosistemas acuáticos (Cross, 1981, Terkina *et al.*, 2006). Recientemente, el medio marino se ha perfilado también como un reservorio de compuestos naturales bioactivos que presentan características químicas estructurales no encontradas en sistemas terrestres (Kekuda *et al.*, 2010). Una posible justificación para esta variabilidad radica en las diferencias en las características biológicas y a las capacidades metabólicas y fisiológicas de las actinobacterias marinas, lo cual ofrece un enorme potencial y gran interés debido a la posibilidad de descubrir nuevos productos naturales y compuestos bioactivos (Jiang & Xu, 1996, León *et al.*, 2007, Sharma, 2010, Sharma, 2014).

En Colombia, se han estudiado las actinobacterias en diferentes regiones, sin embargo, los estudios realizados se han enfocado principalmente al aislamiento de actinobacterias en fuentes terrestres y poco se conoce acerca de la microbiota presente en hábitats de agua dulce. En zonas como la Orinoquia Colombiana, donde se han hecho muy pocos estudios de diversidad y ecología microbiana, podría encontrarse un reservorio de compuestos bioactivos aún no explorados en las actinobacterias autóctonas. Por tal

motivo, el presente trabajo está enfocado a estandarizar una metodología de aislamiento de este tipo de bacterias y a explorar la biodiversidad y potencial antimicrobiano en estos ambientes poco estudiados, como la Orinoquia Colombiana.

2. Marco teórico

2.1. Características de las actinobacterias

Las actinobacterias son bacterias Gram positivas, saprófitas con un alto contenido de G+C en su ADN. Se encuentran ampliamente distribuidas en el suelo, donde desempeñan un papel importante en la descomposición de la materia orgánica (Kampfer, 2006). Sin embargo, también se encuentran en ambientes acuáticos de agua salada y dulce (Leiva P *et al.*, 2004). Estas bacterias pertenecen al phylum *Actinobacteria*, el cual se divide en 5 subclases, 9 órdenes, 55 familias, 240 géneros y 3000 especies (Goodfellow & Fiedler, 2010). Durante mucho tiempo se pensó que las *Actinobacterias* eran hongos debido a la similitud en sus características morfológicas y a la presencia de un micelio verdadero; sin embargo se han clasificado como bacterias por su carácter procariota y los componentes de su pared celular, en particular la composición de lípidos y peptidoglicano. La mayoría de las especies de este grupo crecen en forma de filamentos delgados formando hifas y esporas asexuales. Su morfología celular tradicionalmente ha sido descrita como difteroidal y filamentosa, sin embargo algunas actinobacterias producen solo células cocoides o cocobacilares (Whitman *et al.*, 2012). La mayoría de actinobacterias son mesófilas y sus condiciones más favorables de crecimiento se encuentran entre 25 y 30 °C, aunque también se han reportado especies termofílicas que registran crecimiento a 50-60 °C. Estos microorganismos generalmente son aerobios y tienen la capacidad de degradar macromoléculas debido a la producción de enzimas extracelulares (Kampfer, 2006).

Las actinobacterias se caracterizan por la amplia producción de micelio vegetativo, pero además producen un micelio aéreo o secundario que muestra modos característicos de ramificación. Durante el ciclo de vida, esas hifas son transformadas en cadenas de esporas, las cuales son llamadas conidias o artrosporas. (Kampfer, 2006).

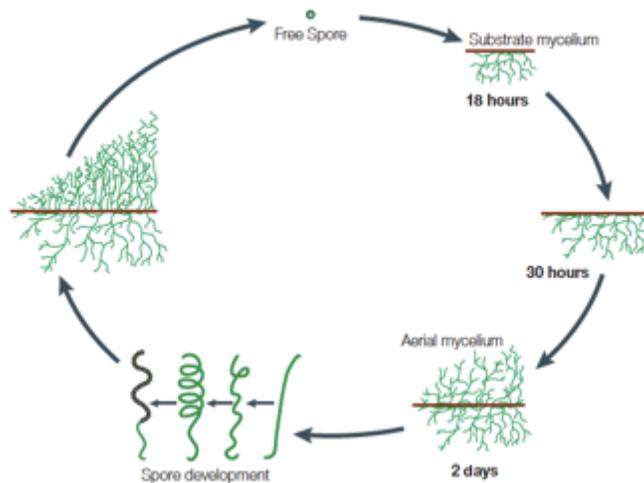


Figura 1. Ciclo de vida de *Streptomyces coelicolor*. Tomado de: Angert, 2005.

La figura 1 muestra el ciclo de vida de *S. coelicolor*, el cual se generaliza para bacterias pertenecientes al género *Streptomyces*. El ciclo inicia con la germinación de una espora, dicha germinación puede depender de la presencia de factores de señalización y hay evidencias que nutrientes como el agua y el calcio (Ca^{+2}) son necesarios. Esta espora produce un filamento de hifas, las cuales crecen por extensión de punta. Estas ramificaciones o hifas se sitúan sobre la superficie y dentro del medio de cultivo forman el micelio vegetativo. Los filamentos penetran el medio mediante el uso de enzimas hidrolíticas extracelulares con el fin de usar las moléculas orgánicas disponibles. Cuando los nutrientes se agotan, una cascada compleja de señalización desencadena la producción de un compuesto tensoactivo que recubre algunos filamentos emergentes, dando lugar a la formación del micelio aéreo lejos del sustrato o micelio vegetativo. Posteriormente, cada célula se divide dando lugar a la formación de esporas (Angert, 2005).

2.2. Importancia de las actinobacterias como fuente de compuestos antimicrobianos

Las actinobacterias han sido tradicionalmente aisladas de fuentes terrestres pero en la actualidad existe un gran interés por reorientar su búsqueda a sedimentos de ríos, lagos y océanos, debido a los recientes descubrimientos de cepas aisladas en fuentes marinas que generan grandes perspectivas como generadoras de productos de interés farmacéutico (Leiva P *et al.*, 2004, Manivasagan *et al.*, 2014). “Los compuestos bioactivos extraídos de fuentes marinas poseen distintas e innovadoras estructuras químicas que

son base para la síntesis de nuevos medicamentos” (Kekuda *et al.*, 2010). En los últimos años han aumentado las investigaciones y hallazgos de metabolitos secundarios de origen marino, a la vez que ha disminuido notablemente el número de compuestos aislados de actinobacterias de origen terrestre, debido principalmente al redescubrimiento de especies y metabolitos secundarios (Parés & Juárez, 1997, Newman & Cragg, 2007, Solano *et al.*, 2009).

La importancia de las actinobacterias radica en que son los microorganismos que más agentes antimicrobianos han aportado en el tratamiento de enfermedades y con mayor frecuencia producen compuestos inhibidores del crecimiento de bacterias patógenas. Aproximadamente, 22.500 metabolitos secundarios bioactivos han sido aislados de microorganismos, de los cuales 10.000 de esos compuestos han sido producidos por actinobacterias, lo que representa el 45% de los metabolitos secundarios bioactivos que se han descubierto (Berdy, 2005, Demain & Sanchez, 2009, Solecka *et al.*, 2012). Cerca de 7.600 de estos compuestos, es decir el 75% han sido producidos por el género *Streptomyces*. Sin embargo, otras *Actinobacterias* como *Actinomadura*, *Marinispora*, *Saccharopolyspora*, *Nocardiosis*, *Salinispora*, *Verrucosispora*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora* y *Actinoplanes* también producen metabolitos secundarios bioactivos pero en menor proporción (Solecka *et al.*, 2012, Manivasagan *et al.*, 2014). Las actinobacterias son capaces de producir compuestos de gran importancia y aplicación no solo en farmacología sino en diferentes áreas como la agricultura, la biotecnología y el sector industrial (Wiwin, 2010). Además se ha demostrado que estos compuestos poseen actividad citotóxica, antitumoral, antiviral, antiparasitaria, insecticida, antifúngica, antiinflamatoria, antioxidante, inmunosupresora y además presentan inhibición enzimática (Bull & Stach, 2007, Kekuda *et al.*, 2010).

En la actualidad muchos investigadores se han centrado en la búsqueda y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos debido al incremento en el número de patógenos resistentes (Sharma *et al.*, 2011). Según la Organización Mundial de la Salud, la resistencia a los antimicrobianos es considerada como una amenaza para la salud pública, debido a la limitación de opciones terapéuticas, a causa del uso y el abuso de compuestos antimicrobianos, lo que ha generado una expansión de microorganismos resistentes, donde los fármacos usados actualmente pierden eficacia (WHO, 2001). En Colombia, el grupo para el control de la resistencia bacteriana en Bogotá (GREBO) es el

encargado de investigar el comportamiento de la resistencia antimicrobiana en los hospitales de tercer nivel con el fin de implementar estrategias que permitan minimizar su impacto. Las siguientes tablas muestran los perfiles de resistencia de los casos reportados en Colombia para pacientes adultos en servicio de hospitalización según GREBO durante el año 2013 (tablas 1 y 2).

Tabla 1. Perfil de resistencia en Gram negativos en los servicios de hospitalización adultos en Colombia.
GREBO 2013.

Antibióticos		<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. marcescens</i>
BLEE	n	6253	2167				
	%R	15	30,3				
SAM	n	6808	2315	349	297		
	%R	35,1	52,2	59,6	36		
TZP	n	5564	2100	578	109	1073	251
	%R	5,6	33,1	22,7	55	18,5	19,5
CAZ	n	7047	2369	639	291	1691	401
	%R	16,1	39,6	29,4	29,2	21,8	22,9
CRO	n	6975	2438	651			416
	%R	16,9	40,7	34,7			31,5
CTX	n	5642	1537	381			252
	%R	13,9	38,8	30,4			34,1
FEP	n	7137	2480	652		1773	416
	%R	16,9	41	17		17,2	16,3
ATM	n	4566	1487	388	170	947	
	%R	17,2	44,1	26,5	68,2	24,6	
ETP	n	2102	1057	293	186	940	183
	%R	0,3	13,3	6,8	57	31,5	8,2
IPM	n	7093	2476	645	293	1768	417
	%R	0,3	14,2	6,7	56,7	24	7,2
MEM	n	7300	2507	659	281	1782	422
	%R	0,5	5,2	11,8	14,2	17,5	15,4
GEN	n	7304	2507	659			422
	%R	16,9	24,8	19,9			27,7
CIP	n	7308	2511	657		1784	422
	%R	28,7	21,6	15,1		23,6	8,3
SXT	n	6212	1825	435			287
	%R	41,8	34,5	23			18,1
TGC	n				153	727	
	%R				1,3	3,6	

BLEE: betalactamasa de espectro extendido, SAM: ampicilina sulbactam, TZP: piperacilina/tazobactam, CAZ: ceftazidima, CRO: ceftriaxona, CTX: cefotaxima, FEP: cefepime, ATM: aztreonam, ERT: ertapenem, IPM: imipenem, MEM: meropenem, AMK: amikacina, GEN: gentamicina, CIP: ciprofloxacina, SXT: trimetoprim/sulfametoxazol, COL: colistina.

Tabla 2. Perfil de resistencia en Gram positivos en los servicios de hospitalización adultos. GREBO 2013.

Antibióticos		<i>S. aureus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
OXA	n	1962		
	%R	34,8		
GEN	n	1991		
	%R	6,5		
RIF	n	2001		
	%R	2,2		
LNZ	n	2006	210	826
	%R	0,8	1	0,8
CIP	n	1797		
	%R	6,2		
VAN	n	2008	210	828
	%R	0	34,8	0,6
SXT	n	2002		
	%R	2,3		
CLI	n	2005		
	%R	9,9		
ERY	n	2004		
	%R	16,5		
TCY	n	2000		
	%R	18,9		
GEH	n		200	795
	%R		12,5	19,6
AMP	n		210	832
	%R		78,1	2,2

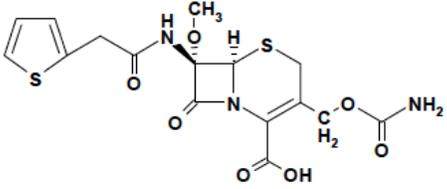
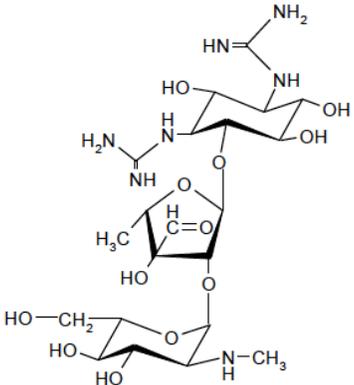
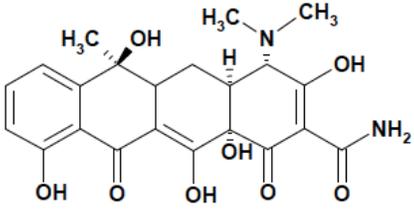
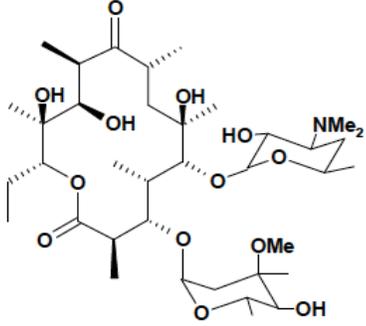
OXA: oxacilina, GEN: gentamicina, RIF: rifampicina, LNZ: linezolid, CIP: ciprofloxacina, VAN: vancomicina, SXT: trimetoprim sulfametoxazole, CLI: clindamicina, ERY: eritromicina, TCY: tetraciclina, GEH: gentamicina alta carga, AMP: ampicilina.

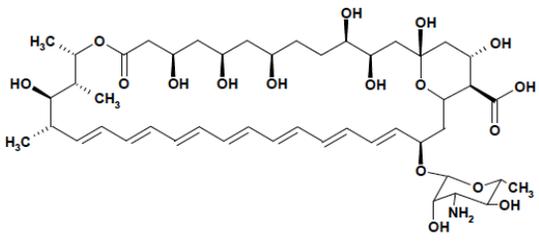
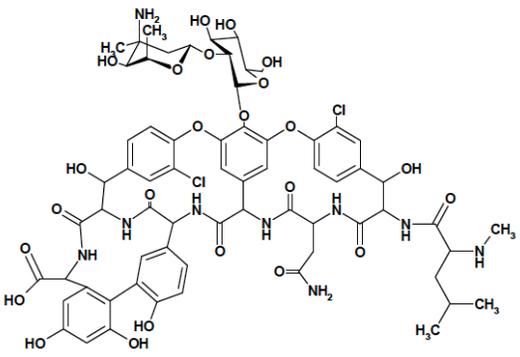
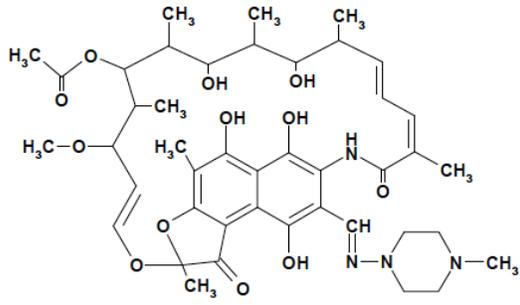
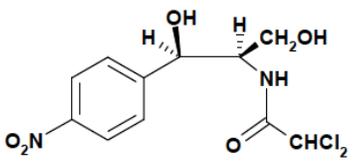
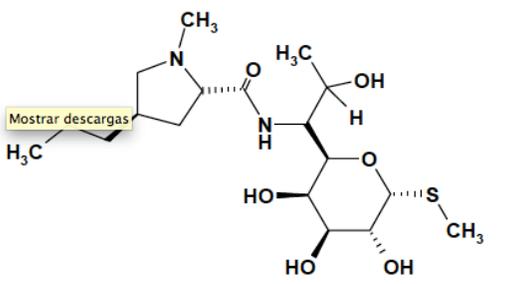
A causa del rápido desarrollo de la resistencia antimicrobiana y la toxicidad de algunos antibióticos, se ha incrementado la incidencia de diversas enfermedades por falta de tratamientos efectivos y riesgo continuo de transmisión, por lo que diversas investigaciones han centrado sus estudios hacia la búsqueda de metabolitos secundarios a partir de microorganismos, principalmente aquellos obtenidos de *Actinobacterias*, debido a su gran capacidad de producción (Oskay *et al.*, 2004, Leal *et al.*, 2014). A pesar de la

enorme cantidad de compuestos bioactivos reportados a partir de *Actinobacterias*, recientes investigaciones de secuenciación de genoma han revelado la presencia de docenas de metabolitos secundarios en *clusters* de genes (agrupación de genes que cumplen una función biológica en común), lo cual indica que las *Actinobacterias* aún contienen grandes reservorios de agentes terapéuticos potencialmente útiles. Sin embargo, la mayoría de éstos parecen ser inactivos bajo las condiciones en las que han sido estudiadas dichas bacterias (Seyedsayamdost *et al.*, 2012). Además de esto, se estima que cada cepa de *Actinobacteria* es genéticamente capaz de producir entre 10 y 20 metabolitos secundarios (Elamvazhuthi & Subramanian, 2013), por esta razón las *Actinobacterias* continúan siendo fuentes promisorias en el descubrimiento de antibióticos y otros compuestos bioactivos.

Los metabolitos secundarios mas importantes producidos por microorganismos son antibióticos, cerca del 80% de los antibióticos han sido producidos por el género *Streptomyces*. A pesar de los avances en los procesos de producción de diversos antibióticos, las infecciones bacteriana aún persisten y causan aproximadamente 17 millones de muertes al año, afectando principalmente a niños y ancianos (de Lima Procópio *et al.*, 2012). Aunque los antibióticos producidos por actinobacterias presentan gran diversidad química, se pueden agrupar en familias de acuerdo al mecanismo de acción y la similitud en la estructura química (Evangelista-Martínez & Moreno-Enríquez, 2007). La tabla 3 muestra la clasificación de los principales antibióticos producidos por actinobacterias.

Tabla 3. Clasificación de los principales antibióticos producidos por actinobacterias según la estructura química. Tomado de: Evangelista-Martínez & Moreno-Enríquez, 2007

Clasificación	Antibiótico	Estructura
β-lactámicos	<p>Cefoxitina (cefamicina semisintética) Inhibe síntesis de pared celular</p>	
Aminoglucósidos	<p>Estreptomina Inhibe síntesis de proteínas Unión en la subunidad ribosomal 30S</p>	
Tetraciclinas	<p>Tetraciclina Inhibe síntesis de proteínas Unión en la subunidad ribosomal 30S</p>	
Macrólidos	<p>Eritromicina Inhibe síntesis de proteínas Unión en la subunidad ribosomal 30S</p>	

<p>Polienos</p>	<p>Amfotericina B Alteración de permeabilidad en la membrana</p>	
<p>Glicopéptidos</p>	<p>Vancomicina Inhibe síntesis de pared celular</p>	
<p>Rifamicinas</p>	<p>Rifampicina Inhibición de síntesis de RNA Unión a la RNA polimerasa</p>	
<p>Fenicoles</p>	<p>Cloranfenicol Inhibe síntesis de proteínas Unión en la subunidad 50S</p>	
<p>Azúcares complejos</p>	<p>Lincomicina Inhibe síntesis de proteínas Unión en la subunidad ribosomal 30S</p>	

2.3. Hábitat

Las bacterias pertenecientes a la familia *Streptomycetaceae* se encuentran distribuidas en múltiples hábitats, pero sin duda el suelo es el hábitat natural y preferido, ya que cuenta con las condiciones adecuadas para su crecimiento y proliferación. Su supervivencia en suelos se encuentra influenciada por la competencia exitosa con otros microorganismos, debido principalmente a las siguientes razones: los *Streptomyces* son capaces de degradar residuos de plantas y animales relativamente complejos, incluyendo polisacáridos y compuestos aromáticos. Los *Streptomyces* no requieren fuentes de nitrógeno orgánico, vitaminas ni factores de crecimiento para su desarrollo. El suelo como hábitat brinda soporte al crecimiento micelial y la formación de esporas permite que puedan adaptarse a cambios de diversas condiciones físicas del suelo, como cambios en la aireación, humedad y pH; además a periodos de sequía, heladas y condiciones anaeróbicas. Las esporas pueden ser consideradas como una etapa semi latente en el ciclo de vida que facilita la supervivencia en el suelo por largos periodos de tiempo (Kampfer, 2006).

Aunque el suelo es el hábitat más importante para las *Actinobacterias*, hay otros biotopos donde se encuentran distribuidas debido principalmente a la presencia de suelos o sedimentos, como: forraje y otros tipos de material orgánico, además de hábitats marinos y de agua dulce. Las *Actinobacterias* pueden ser aisladas de ecosistemas de agua dulce, especialmente de sedimentos de ríos y lagos, donde muchos de estos microorganismos no se encuentran activos, pero pueden sobrevivir en forma de esporas durante un largo tiempo y en el caso de los ambientes marinos, los *Streptomyces* pueden ser aislados de zonas litorales y costeras, así como de sedimentos de aguas profundas. Se considera que las *Actinobacterias* son arrastradas a los afluentes de agua desde suelos, fangos, estiércol de animales, vegetación en descomposición, entre otros (Kampfer, 2006).

2.3.1 Estudios de *Actinobacterias* en fuentes acuáticas de agua dulce

Las *Actinobacterias* se encuentran ampliamente distribuidas en ambientes acuáticos de agua dulce. (Eiler & Bertilsson, 2004, Allgaier & Grossart, 2006). Los lagos y ríos han sido objeto de investigaciones, con el fin de hallar cepas silvestres con potencial actividad biológica. La tabla 4 muestra diversas investigaciones de actividad antimicrobiana realizadas en ambientes acuáticos de agua dulce en distintos continentes.

Tabla 4. Estudios de *Actinobacterias* con actividad antimicrobiana en ambientes de agua dulce.

América				
Sitio de recolección	Actinobacterias aisladas	Actinobacterias	Actividad antimicrobiana	Referencia
Sedimentos del río Hudson, Estados Unidos	165	<i>Streptomyces</i>	22 exhibieron actividad antifúngica contra <i>Candida krusei</i> y <i>Trichoderma viride</i>	(Pisano et al., 1987)
Muestras de sedimentos de ríos y lagos, Chile	62	<i>Streptomyces</i>	31 mostraron actividad antimicrobiana contra <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Candida albicans</i>	(Leiva P et al., 2004)
Asia				
Muestras de agua y sedimento (749) de 12 lagos, Yunan China	1741	16 géneros, siendo el más predominante <i>Micromonospora</i>	6 presentaron actividad contra <i>Bacillus subtilis</i> y 118 contra <i>Aspergillus niger</i>	(Jiang & Xu, 1996)
Sedimentos del río Krishna, India	80	<i>Streptomyces</i>	12 mostraron actividad antibacteriana y 9 actividad antifúngica	(Ellaiah et al., 2002)
Sedimentos del lago Loktak, India		<i>S. sindenensis</i>	actividad antimicrobiana contra <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus sphaericus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Candida albicans</i>	(Ningthoujam et al., 2009)
Muestras de sedimentos del río Nambal y lago Loktak, India	35	<i>S. mutabilis</i>	significativa actividad contra <i>Candida albicans</i> y actividad antagonista contra los hongos patógenos <i>Bipolaris oryzae</i> , <i>Curvularia oryzae</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Pyricularia oryzae</i>	(Sanasam & Ningthoujam, 2010)
Río Nambal, India	156	<i>Streptomyces</i> <i>Micromonospora</i> <i>Nocardia</i>	23 cepas mostraron una zona de inhibición mayor al 50% contra uno o más de los patógenos probados: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus niger</i>	(Ningthoujam et al., 2011)
Río Cauvery, India	5	<i>Isoptericola variabilis</i>		(Muthu et al., 2013)
Sedimentos del lago Loktak, India		<i>S. sannanensis</i> SU118	actividad antibacteriana contra <i>S. aureus</i> , <i>Mycobacterium smegmatis</i> y <i>Bacillus circulans</i>	
África				
Muestras de agua y sedimento (114) del río Nilo, entre Giza y Cairo	68	<i>Streptomyces</i> <i>Micromonospora</i>	11 presentaron actividad antifúngica contra <i>Aspergillus niger</i> y <i>Trichoderma viride</i>	(Rifaat, 2003)
Muestras de agua y sedimento del lago Tana, Etiopía	31	<i>Streptomyces</i>	11 exhibieron actividad contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Gebreyohannes et al., 2013)
Europa				
Muestras de agua, sedimento y esponjas del lago Baikal, Rusia	154	<i>Streptomyces</i> <i>Micromonospora</i>	actividad antibacteriana contra <i>Bacillus cereus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Terkina et al., 2006)

Estos estudios muestran el gran potencial que tiene el medio acuático de agua dulce en cuanto al hallazgo de compuestos con actividad antimicrobiana.

2.3.2. Estudios de *Actinobacterias* en Colombia

En Colombia, se han llevado a cabo algunas investigaciones de aislamiento de actinobacterias con potencial actividad antimicrobiana, principalmente enfocada hacia la inhibición de hongos fitopatógenos. Dos actinomicetos del género *Nocardia* fueron aislados de suelos rizosféricos, los cuales mostraron actividad antibacterial contra *Staphylococcus aureus* (González *et al.*, 1992). En 2002, fueron aisladas 18 cepas de actinobacterias provenientes de un cultivo de vid, con el fin de evaluar su actividad antagónica contra *Botrytis cinerea*, donde se encontró que uno de los aislamientos presentó inhibición contra este hongo causante de la pudrición gris en plantas de vid (Hernández, 2002). Márquez y colaboradores aislaron 30 actinobacterias provenientes de la rizósfera de diferentes cultivos de clavel de la sabana de Bogotá y evaluaron su antagonismo contra *Fusarium oxysporum* causante del marchitamiento vascular en dichos cultivos (Márquez *et al.*, 2002). En 2003, se realizó un estudio con cepas de actinobacterias y *Trichoderma* spp. aisladas a partir de suelos de cultivos de arroz con el fin de evaluar su antagonismo contra *Rhizoctonia solani* (Orjuela *et al.*, 2003). Fonseca y colaboradores encontraron que 8 cepas de actinobacterias aisladas de purines o extractos fermentados de plantas de chipaca inhiben el crecimiento de *Phytophthora infestans*, causante del tizón tardío de la papa (Fonseca Ardila *et al.*, 2011). Otero evaluó la actividad antagonista de actinobacterias contra microorganismos patógenos para el cultivo del plátano, donde encontró que tres de los aislamientos presentaron actividad contra *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Fusarium oxysporum*, *Ralstonia solanacearum*, y *Pectobacterium caratovorum* (Otero, 2011).

En 2013, se evaluó el potencial biológico de actinobacterias aisladas del suelo del Jardín Botánico de la universidad tecnológica de Pereira frente a *Ralstonia solanacearum*, hongo causante de la marchitez del plátano y banano (Peña & Castaño, 2013). Recientemente, fue estudiada la inhibición de un cepario de aislamientos de *Burkholderia glumae* provenientes de plantas de arroz por parte de tres cepas de *Streptomyces* con el fin de evaluar su capacidad biocontroladora (Vinchira, 2014). En el departamento del Guaviare, se estudio la diversidad de actinomicetos en suelos bajo sistemas agroforestales con cultivos de Arazá y Cocona (Ramírez Millán, 2010). Estos estudios muestran el gran potencial antimicrobiano de actinobacterias aisladas en territorio Colombiano, lo cual contribuye a su conocimiento y motiva al desarrollo de nuevas investigaciones en diferentes ambientes y regiones del país

2.4. Ambiente de estudio: Río Guaviare

Colombia es un país tropical caracterizado por su gran biodiversidad, siendo el Amazonas uno de los lugares de mayor diversidad de especies (macro-organismos) en todo el mundo, estimaciones sugieren que más del 50% de la biodiversidad mundial se halla en esta zona; además de ello se destaca por la presencia de zonas selváticas aún no intervenidas por el ser humano (Cardona *et al.*, 2009). Los principales ríos que recorren la amazonia colombiana son el río Guaviare, Caquetá, Putumayo y parte del Amazonas. Estos ríos se caracterizan por la presencia de gran cantidad de sedimentos, la mayoría de ellos de tipo arcilloso provenientes de la Cordillera de los Andes, “el río en su recorrido desplaza grandes cantidades de sedimentos los cuales son depositados en sus orillas” (Mendoza *et al.*, 1999). El río Guaviare es el río más corto del país y presenta un 7% de longitud navegable (Paredes *et al.*, 2010). Esta región del país presenta un régimen de lluvias unimodal, en San José del Guaviare la precipitación media multianual es de 2499 mm. La temperatura media en la región es de 25.3 °C., con mínima promedio de 21.5 °C y máxima promedio de 30.2 °C. Las temperaturas mínimas se presentan entre los meses de junio a agosto y las máximas en diciembre a enero (SIAT-AC, 2005). Las zonas aledañas al curso del río se caracterizan por la presencia de bosques riparios, constituidos principalmente por vegetación arbórea, la cual tiene un papel importante en la preservación del recurso hídrico y como albergue para la fauna en épocas secas (Leiva Franco, 1998).

El 90% de los suelos de la Amazonia Colombia son de denudación y se caracterizan por su alta acidez (pH 3,5-5,5), poca capacidad de intercambio catiónico, carencia de minerales intercambiables como: calcio, magnesio y potasio, además de altas concentraciones de aluminio. La mayor actividad microbiana sobre la materia orgánica acumulada en los suelos de esta región se presenta en los primeros 20 cm, en los horizontes orgánicos y el horizonte A del suelo (Peña & Cardona, 2010). Estudios realizados en suelos de la región Amazónica del país y en cercanías a San José del Guaviare indican la presencia de poblaciones de actinobacterias, donde el género más representativo es *Streptomyces* sp. (Cardona *et al.*, 2005, Cardona *et al.*, 2009). Igualmente, se ha encontrado mayor abundancia de actinobacterias en suelos de bosque en comparación a pastizales y rastrojo de la Amazonia, lo cual se relaciona con la diversidad estructural de la población vegetal típica de este ecosistema (Peña & Cardona,

2010). Estas características hacen de esta zona un lugar de gran interés para estudios e investigaciones que permitan el hallazgo de diversos productos que pueden ser benéficos para la sociedad.

3. Objetivos

3.3. Objetivo General

Determinar el potencial antibacterial y antifúngico de *Actinobacterias* cultivables aisladas de sedimentos de las riberas del río Guaviare con fines bioprospectivos.

3.4. Objetivos específicos

- Identificar morfológicamente *Actinobacterias* aisladas de muestras de sedimento colectadas en las riberas del río Guaviare.
- Determinar la actividad antibacterial (frente a de *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis*, *A. baumannii* y *K. pneumoniae*) y antifúngica (frente a *Fusarium* sp., *T. harzianum* y *C. gloeosporioides*) de los cultivos de *Actinobacterias* provenientes del río Guaviare.
- Caracterizar molecularmente las *Actinobacterias* aisladas del río Guaviare que presenten un alto potencial antibacterial y antifúngico.

4. Metodología

El presente trabajo de investigación se desarrolló con base al esquema metodológico general presentado en la figura 2.

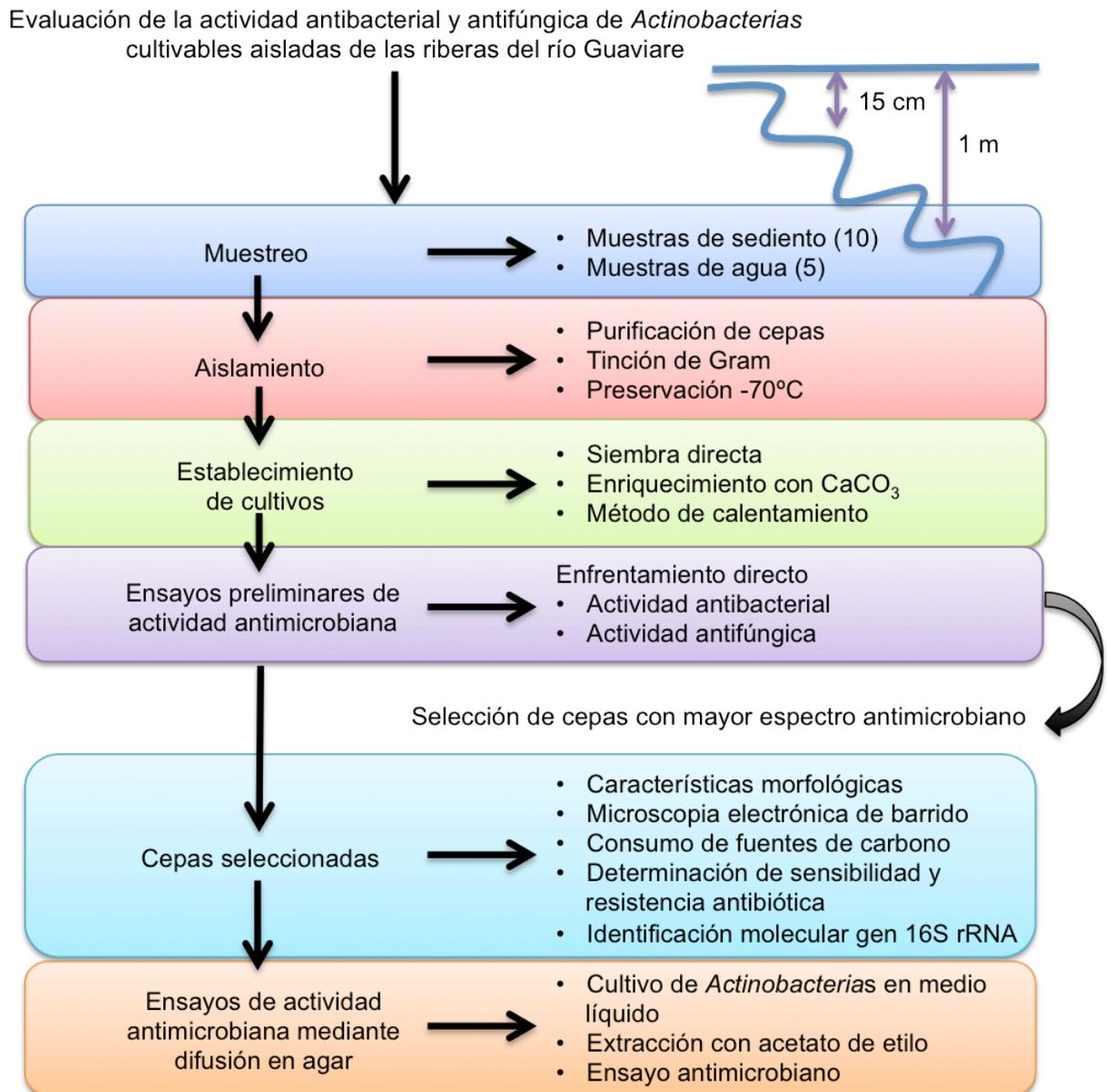


Figura 2. Esquema de metodología general seguida para el desarrollo del proyecto.

4.1. Recolección de las muestras

Fueron recolectadas 15 muestras de agua (5) y sedimento (10) de las riberas del río Guaviare durante el mes de mayo de 2014. Las muestras de sedimento se colectaron a 15 cm y 1 m de profundidad a nivel del agua; cada una de ellas en 5 puntos específicos del río Guaviare donde también fueron tomadas las muestras de agua superficial (tabla 5).

Tabla 5. Sitios de recolección de muestras en las riberas del río Guaviare.

Sitios de recolección	Coordenada
1	18N 756.317E 283.931N
2	18N 756.969E 287.152N
3	18N 754.902E 288.080N
4	18N 757.697E 286.555N
5	18N 757.277E 286.985N

Estos sitios fueron elegidos por su alejamiento de sitios poblados, poca contaminación y desconocimiento de la microbiota presente. Las muestras fueron recolectadas usando una espátula estéril y tubos cónicos de 50 mL estériles, éstas fueron codificadas de acuerdo al sitio de recolección y tipo de muestra, posteriormente fueron transportadas a temperatura ambiente al laboratorio de Bioprospección de la Universidad de La Sabana (Leiva P *et al.*, 2004, El-Sayed, 2012).



Figura 3. Sitios de recolección de muestras de agua y sedimento en las riberas del río Guaviare. Mapa de Colombia tomado de: <http://www.lospaises.com.ar/suramerica/colombia.html>

4.2. Aislamiento de los microorganismos

4.2.1. Siembra directa

En el sitio de recolección cada una de las muestras fue sembrada por duplicado en agar almidón caseína nitrato (SC), agar avena (ISP3) y agar caseína almidón (ACA) suplementado con cicloheximida (50 mg/mL) y ácido nalidíxico (10 mg/mL), las placas de aislamiento fueron incubadas a 30 °C durante 8 días (Hemashenpagam, 2011, Duncan *et al.*, 2014).

4.2.2. Enriquecimiento con carbonato de calcio

Cada una de las muestras fue mezclada con carbonato de calcio (CaCO₃) en proporción 5:1 p/p (Gurung *et al.*, 2009) y posteriormente la mezcla se incubó a 45°C durante 1h (Nanjwade *et al.*, 2010). Al cabo de este tiempo, se realizaron diluciones seriadas hasta 10⁻³ y fueron sembrados 100 µL de muestra sobre medio agar avena (ISP3) y agar caseína almidón (ACA) suplementado con cicloheximida (50 mg/mL) y ácido nalidíxico (10 mg/mL). Las placas de aislamiento fueron incubadas a 30 °C durante 8 días.

4.2.3. Método de calentamiento

El método consistió en mezclar 1 mL de sedimento húmedo o 1mL de agua con 10 mL de agua de cada uno de los puntos de muestreo previamente filtrada con acrodiscos de membrana H Tuffryn de porosidad 0,2 µm. Las muestras se calentaron por 6 min a 55 °C, y posteriormente fueron sembrados 100 µL de muestra sobre medio agar avena (ISP3) y agar caseína almidón (ACA) suplementado con cicloheximida (50 mg/mL) y ácido nalidíxico (10 mg/mL). Las placas de aislamiento fueron incubadas a 30 °C durante 8 días (Duncan *et al.*, 2014).

4.3. Aislamiento en cultivo puro y selección de cepas

Fueron seleccionadas las colonias que presentaron morfología característica de *Actinobacterias* y posteriormente evaluadas teniendo en cuenta la tinción de Gram. Cada una de las colonias obtenidas fue sub-cultivada en medio agar avena (ISP3) para garantizar el aislamiento de colonias puras. Posterior a la purificación, cada uno de los aislamientos fueron preservados en glicerol (40% v/v) y almacenados a -70°C con el fin de

iniciar la construcción del cepario de actinobacterias del Grupo de Investigación en Bioprospección de la Universidad de La Sabana (Shepherd *et al.*, 2010).

4.4. Ensayos preliminares de actividad antimicrobiana

4.4.1. Microorganismos evaluados

Dentro de los microorganismos probados, se encuentran dos bacterias Gram positivas, cuatro Gram negativas y tres hongos, los cuales fueron seleccionados por su relevancia clínica en el caso de las bacterias y fitopatógena para los hongos, teniendo en cuenta su disponibilidad en el cepario de microorganismos del grupo de investigación en Bioprospección de la Universidad de La Sabana.

4.4.2. Evaluación de la actividad antibacterial de las cepas

La actividad antibacterial fue determinada inicialmente mediante el método de enfrentamiento directo. Cada uno de los aislamientos fue cultivado sobre agar Mueller-Hinton mediante sembrado masivo cubriendo un tercio de la caja e incubados a 30 °C durante 7 días. Al cabo de este tiempo, las placas fueron inoculadas realizando una raya en un ángulo de 90° a 3 mm distancia de los aislamientos con las siguientes bacterias: *Escherichia coli* ATCC 23724, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Bacillus subtilis* ATCC 21556, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 y *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532. Estas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h y el antagonismo se observó por la inhibición del microorganismo probado presentado de la siguiente manera: inhibición de crecimiento 70-100% (+++): actividad alta, inhibición 50% (++) : actividad moderada, inhibición 25% (+): actividad baja, no inhibición (-). La figura 4 muestra el esquema seguido para la realización de la prueba de enfrentamiento directo (Madigan *et al.*, 2012, Omran & Kadhem, 2012, Kumar *et al.*, 2014).

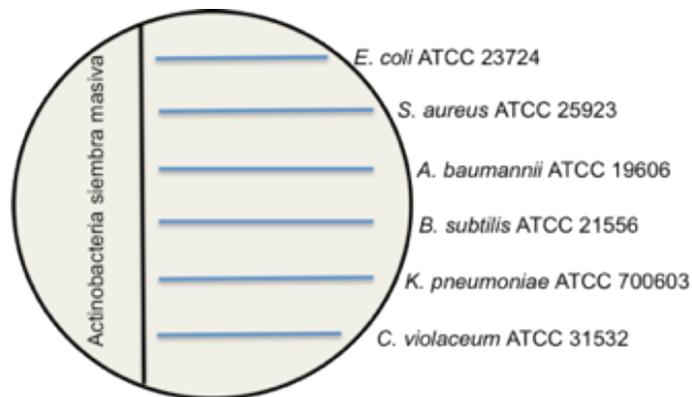


Figura 4. Esquema seguido para la realización del ensayo antibacterial por enfrentamiento directo.

4.4.3. Cultivo de *Actinobacterias* en medio líquido

Los aislamientos fueron inoculados en 10 mL de caldo de extracto de malta/levadura (ISP2) usando hisopos estériles. Los cultivos fueron incubados a 30 °C durante 72 h con agitación a 200 rpm. Al cabo de este tiempo, 10 mL de medio ISP2 fue inoculado con 1 mL del cultivo anterior e incubados por 7 días más, bajo las mismas condiciones. Posteriormente, el sobrenadante fue separado mediante centrifugación a 8000 rpm por 10 min y usado para el ensayo de actividad antifúngica (Silambarasan *et al.*, 2012, Sudha & Masilamani, 2012, Duncan *et al.*, 2014).

4.4.4. Evaluación de la actividad antifúngica de las cepas

La actividad antifúngica se determinó mediante ensayos de difusión en placas de agar, usando los caldos de fermentación (numeral 4.4.2). El experimento consistió en preparar cajas Petri con 25 mL de agar PDA, donde en el centro fueron colocados discos de 8 mm de los hongos prueba: *Fusarium* sp. H24, *Trichoderma harzianum* H5 y *Colletotrichum gloeosporioides*. Posteriormente, fueron transferidos 160 µL de sobrenadante de caldo de fermentación a cada uno de los pozos y las cajas permanecieron a temperatura ambiente durante 30 min para permitir la difusión de los compuestos. Estas fueron incubadas a 25 °C de 5 a 10 días, pasado este tiempo los halos de inhibición fueron medidos y categorizados de la siguiente manera: diámetro <10 mm: + actividad baja, diámetro entre 10-20 mm: ++ actividad moderada y diámetro >20: +++ actividad alta. Como control positivo fue usado terbinafina al 1% (Silambarasan *et al.*, 2012, Kanini *et al.*, 2013).

Caracterización y determinación de la actividad antimicrobiana de las cepas seleccionadas con mayor potencial bioactivo

Una vez terminados los ensayos preliminares de actividad antimicrobiana fueron seleccionadas las cepas que presentaron un mayor espectro de actividad antimicrobiana para la realización de la posterior caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana a partir de extracto crudo de acetato de etilo mediante difusión en agar con el fin de identificar su actividad.

4.5. Observaciones morfológicas y bioquímicas de las cepas seleccionadas

4.5.1. Características morfológicas

Las características morfológicas de los aislamientos seleccionados fueron observadas utilizando diferentes medios de cultivo incluyendo: agar triptona extracto de levadura (ISP1) (Rajan *et al.*, 2012), agar extracto de malta/levadura (ISP2), agar avena (ISP3), agar almidón-sales inorgánicas (ISP4), agar glicerol-asparagina (ISP5) y agar caseína almidón (ACA) (anexo 8.1) (Shirling & Gottlieb, 1966). La forma de las colonias, la tinción de Gram, determinación de color y pigmento fue evaluado en el medio agar avena (ISP3).

4.5.1. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Las bacterias seleccionadas fueron fijadas sobre laminas cubre objetos con solución salina y posteriormente llevadas al horno a 40 °C durante 4 días, pasado este tiempo fueron colocadas en desecador con pentóxido de fósforo durante 1 día para garantizar total sequedad. Seguidamente, se colocaron sobre cintas de carbono para ser observadas en un microscopio electrónico de barrido de mesa Phenom Pro, ubicado en el laboratorio de Cromatografía de la Universidad de La Sabana. Fueron tomadas 3 fotos de cada una de las cepas.

4.5.3. Estudio de consumo de fuentes de carbono

La habilidad de las cepas para consumir 10 compuestos como fuente de carbono fue evaluada usando la técnica basada en el método de Shirling and Gottlieb usando microplatos de 12 pozos con agar basal 5338 (ver anexo 8.1), las fuentes de carbono utilizadas fueron las siguientes: glucosa, lactosa, galactosa, maltosa, ribosa, sacarosa,

xilosa, inositol, fructosa y carboximetilcelulosa (CMC). Fue preparada una solución al 10% de cada uno de los carbohidratos, que se esterilizó mediante filtración en acrodiscos de membrana H Tuffryn de porosidad 0,2 μm . Posteriormente, cada fuente de carbono se mezcló con el medio basal 5338 estéril a una temperatura de 60 °C, llegando a una concentración final del 1%, el plato con glucosa fue el control positivo y el plato con medio basal el control negativo. Los resultados se presentaron de la siguiente manera: crecimiento igual al control negativo (-), crecimiento menor al control positivo (+), crecimiento igual al control positivo (++) , crecimiento mayor al control positivo (+++). La figura 5 muestra el esquema del experimento (Wink, 2009).

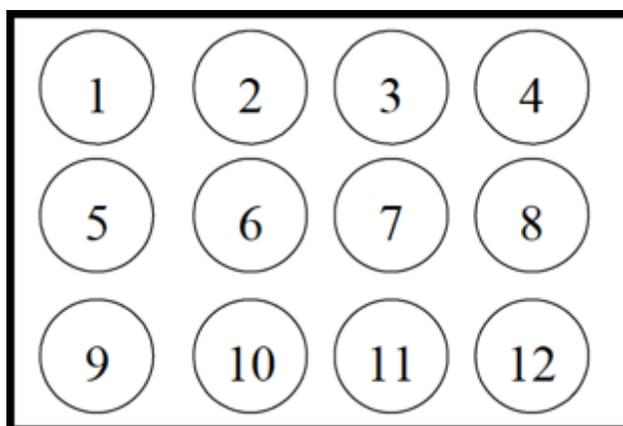


Figura 5. Esquema estudio de consumo de fuentes de carbono. Pocillo 1: glucosa, 2: lactosa, 3: galactosa, 4: maltosa, 5: ribosa, 6: sacarosa, 7: xilosa, 8: inositol, 9: fructosa, 10: carboximetilcelulosa, 11: agar basal inoculado, 12: agar basal sin inocular (control del medio).

4.6. Determinación de sensibilidad y resistencia antibiótica

La sensibilidad y resistencia antibiótica de las cepas seleccionadas fue realizada utilizando los siguientes antibióticos: tetraciclina (20 mg/mL), kanamicina (50 mg/mL), nitrofurantoina (25 mg/mL), ampicilina (50 mg/mL) y gentamicina (20 mg/mL). Cada uno de los antibióticos fueron previamente filtrados en acrodiscos de membrana H Tuffryn de porosidad 0,2 μm y mezclados con agar ISP3 estéril a 60 °C para obtener una concentración final del 1% de cada uno de los antibióticos. Las bacterias fueron sembradas en cada uno de los medios suplementados con antibióticos e incubadas a 30 °C de 5 a 8 días. Las bacterias fueron clasificadas como sensibles o resistentes de acuerdo a su crecimiento (Kamble & Kulkarni, 2012).

4.7. Identificación molecular de las cepas seleccionadas

4.7.1. Extracción de ADN

Para el proceso de extracción de ADN, las cepas seleccionadas fueron inoculadas en 5 mL de medio ISP2 e incubadas a 30 °C con agitación a 200 rpm durante 8 días (Shirling & Gottlieb, 1966, Duncan *et al.*, 2014). Posteriormente, 1 mL del cultivo fue centrifugado a 4 °C y 12000 rpm durante 10 min, el sobrenadante fue descartado y las células se suspendieron en 300 µL de una solución 10 mM Tris-Cl-1 mM EDTA (pH 7,6-8) con 5 mg/mL de lisozima. Los tubos fueron llevados por 30 min a baño maría a una temperatura entre 30-37 °C, pasado este tiempo fueron adicionados 50 µL de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% a cada uno de los tubos, junto con 85 µL de NaCl 5 M. Posteriormente, fueron adicionados 400 µL de la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoalimilico (25:24:1), los tubos fueron centrifugados durante 10 min a 4 °C y 12000 rpm, y la fase acuosa fue transferida a otro tubo. El ADN se precipitó con la adición de 0,5 mL de isopropanol, seguido de mezcla por inversión y centrifugación a 4 °C y 12000 rpm durante 30 min, donde el isopropanol fue descartado. Finalmente, se adicionó 1mL de etanol frío al 70% y los tubos se centrifugaron durante 10 min a 4 °C y 12000 rpm, el sobrenadante se descartó y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 30 min. Al cabo de este tiempo el ADN se resuspendió en 50 µL de 10 mM Tris-Cl-1 mM EDTA (pH 7,6-8) (Hopwood *et al.*, 1985).

4.7.2. Secuenciación del gen 16S rRNA

El gen 16S rRNA fue amplificado del a partir del ADN extraído usando los oligonucleótidos 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') y 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3') con una reacción de PCR en un volumen de 25 µL, la cual contenía 2U de Taq polimerasa, 2,5 µL de buffer NH₄ 10X, 0,05 mM de cloruro de magnesio, 1 µL de dNTPs 20 mM, 0,7mM de primers y 1 µL de templado de DNA. La reacción de PCR fue llevada a cabo utilizando un termociclador BIO-RAD iCycler usando el siguiente protocolo: temperatura inicial de 95 °C por 3 min, 30 ciclos de 95 °C durante 45s (desnaturalización), 54 °C por 1min (anillamiento), 72 °C durante 1:30 min (elongación) seguido de una extensión final a 72 °C durante 5 min. La reacción de PCR fue confirmada mediante electroforesis (1x TBE, agarosa al 1,5 %, 1 µL SYBR safe DNA gel stain) y comparación frente al marcador de peso molecular Q biogene Leon Marker (Forner *et al.*, 2013).

Las muestras fueron purificadas y secuenciadas en MacroGen (Korea) usando los oligonucleótidos 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'), 518F (5' CCAGCAGCCGCGGTAATACG 3'), 800R (5' TACCAGGGTATCTAATCC 3') y 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3'). De cada cepa se obtuvieron tres secuencias y los resultados representan el consenso de la secuenciación.

4.7.3. Análisis de las secuencias

Las secuencias de las cepas seleccionadas fueron ensambladas usando el programa CLC Main Workbench 7.0 y comparadas con la base de datos LTP 109 - SILVA Living Tree Project (Yarza *et al.*, 2008). Una vez identificados los vecinos más cercanos para cada aislamiento, se descargaron sus secuencias y fueron alineadas usando SINA (Pruesse *et al.*, 2012). El árbol filogenético fue elaborado usando el algoritmo Máxima parsimonia matrix Jukes Cantor como estrategia de agrupamiento en el programa ARB 5.5 (Ludwig *et al.*, 2004, Quast *et al.*, 2013).

4.8. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las cepas seleccionadas

4.8.1. Cultivo de *Actinobacterias* en medio líquido y extracción con disolvente

Los aislamientos fueron inoculados en 10 mL de caldo de extracto de malta/ levadura (ISP2) y Mueller Hinton (MH) usando hisopos estériles. Los cultivos fueron incubados a 30°C durante 72 h con agitación de 200 rpm. Al cabo de este tiempo, 10 mL de medio estéril fue inoculado con 0,5 mL del cultivo anterior e incubados por 7 días más, bajo las mismas condiciones. Los caldos de fermentación fueron extraídos con 10 mL (x2) de acetato de etilo mediante agitación a 200 rpm a temperatura ambiente durante 2 días, la fase orgánica fue separada y evaporada para determinar la cantidad de extracto obtenido. Los extractos fueron resuspendidos en DMSO al 2% para su posterior uso en los ensayos de actividad antimicrobiana (Duncan *et al.*, 2014).

4.8.2. Ensayos de actividad antimicrobiana

Los ensayos de actividad antibacteriana con los extractos crudos fueron realizados usando el método de difusión en agar Kirby-Bauer. Las cajas Petri fueron preparadas con 25 mL de agar Mueller Hinton (MH) y la concentración celular de las bacterias prueba fue ajustada a 0,5 escala McFarland (*S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 23724, *B. subtilis*

ATCC 21556, *A. baumannii* ATCC 19606, *C. violaceum* ATCC 31532 y *K. pneumoniae* ATCC 700603) estas se sembraron uniformemente en la superficie de la caja usando hisopos estériles y se dejaron secar durante 10 min (Chaudhary *et al.*, 2013). Para el caso de los hongos, un disco de 8 mm de los microorganismos prueba (*Fusarium* sp. H24, *T. Harzianum* H5 y *C. gloeosporioides*) fue colocado en el centro de la caja de agar PDA (25 mL). En ambos ensayos 150 μ L del extracto crudo (500 μ g) fueron adicionados en los pozos de las cajas, las cuales se mantuvieron 30 min a temperatura ambiente para permitir la difusión de los compuestos. Las cajas fueron incubadas a 37 °C durante 24h para el caso de las bacterias y a 25 °C de 5-10 días para los hongos. Como controles positivos para las bacterias fueron utilizados los antibióticos rifampicina, norfloxacin y ácido nalidíxico y para los hongos terbinafina al 1%. Los diámetros de los halos de inhibición fueron medidos en mm y categorizados de la siguiente manera: diámetro <10 mm: + actividad baja, diámetro entre 10-20 mm: ++ actividad moderada y diámetro >20: +++ actividad alta. Los experimentos fueron realizados por triplicado (Kanini *et al.*, 2013, Kumar *et al.*, 2014).

5. Resultados y discusión

5.1. Aislamiento de actinobacterias y efecto del pre-tratamiento

Una vez realizados los dos tratamientos de aislamiento y la siembra directa sobre los diferentes medios de cultivo, fueron seleccionadas los aislados con base en las características macroscópicas diferenciales de las colonias de *Actinobacterias*, como el tamaño, forma, color, consistencia y esporulación. Durante el proceso de aislamiento, se tuvieron problemas de contaminación debido al rápido crecimiento de otras especies bacterianas en comparación al crecimiento lento de las posibles *Actinobacterias*, seguido de contaminación por hongos, los cuales crecían encima de los aislamientos, a pesar del uso de cicloheximida en uno de los medios de cultivo. Sin embargo, dichos problemas de contaminación se presentaron en mayor proporción para las bacterias obtenidas mediante siembra directa y aunque el método de enriquecimiento con carbonato de calcio fue más selectivo también se presentó contaminación, probablemente a causa de las pocas diluciones seriadas que se realizaron. Debido a las razones mencionadas anteriormente 37 bacterias obtenidas mediante siembra directa y 29 mediante enriquecimiento con carbonato de calcio no fueron tenidas en cuenta para el paso siguiente de purificación y preservación, pues pese a que se quisieron aislar no fue posible obtener cultivos axénicos de las mismas, igualmente en estos grupos también se descartaron aislados que no presentaban morfología característica de actinobacterias.

El pre-tratamiento mediante carbonato de calcio resultó ser el método más efectivo en el aislamiento de actinobacterias, donde se obtuvo un total de 275 cepas aisladas. Por la metodología de siembra directa se pudo obtener 99 aislamientos, mientras que el tratamiento térmico no arrojó los resultados esperados, pues no se observaron colonias características de actinobacterias. En total se seleccionaron 374 aislamientos. El enriquecimiento con carbonato de calcio permitió aislar más cepas comparado con la siembra sin tratamiento. De igual forma, el medio de cultivo suplementado con antibióticos favoreció el aislamiento de actinobacterias permitiendo una disminución de otros tipos de especies bacterianas. En la actualidad, no se conoce con exactitud el mecanismo de acción del carbonato de calcio, sin embargo se ha demostrado que al mezclar el carbonato de calcio con las muestras aumenta el pH, lo cual facilita el crecimiento de propágulos de actinobacterias y los iones de calcio tienen la habilidad de estimular la formación del micelio aéreo en diferentes cultivos de actinobacterias (Qin *et al.*, 2009).

Con respecto al tratamiento térmico, en las cajas de aislamiento no se evidenció crecimiento de bacterias que presentaran fenotipos de actinobacterias. Diversos protocolos de aislamiento utilizan fases de calentamiento y desecación para seleccionar microorganismos capaces de formar esporas resistentes como es el caso de las actinobacterias (Seyedsayamdost *et al.*, 2012). Un estudio realizado por Williams y colaboradores indica que un tratamiento térmico entre 40-50 °C durante 2-16 h permite un aislamiento selectivo de actinobacterias, pues reduce significativamente la microbiota sin afectar las colonias de actinobacterias (Williams *et al.*, 1972). Recientemente, estudios que han llevado a la identificación de actinobacterias raras (no pertenecientes al género *Streptomyces*) han usado dentro del proceso selectivo de aislamiento tratamientos térmicos. La actinobacteria *Nocardiopsis arvandica* sp nov. fue aislada de muestras de arena del río Arvand (Irán), mediante tratamiento térmico a 120 °C durante 10 min y posterior radiación (Hamedi *et al.*, 2011). *Nonomuraea wenchangensis* sp nov. fue aislada de muestras de suelo rizosférico mediante tratamiento térmico a 100 °C por 1h, seguido de tratamiento con cloramina (Wang *et al.*, 2011). Una nueva especie *Streptosporangium jomthongense* fue aislada de muestras de suelo rizosférico de la planta *Caladium bicolor* mediante pre-tratamiento térmico a 120 °C durante 1 h (Intra *et al.*, 2014). De acuerdo con los estudios anteriormente mencionados, probablemente la razón por la cual el tratamiento térmico no presentó los resultados esperados se debió principalmente al poco tiempo de exposición al calor con respecto a la temperatura a la cual fueron sometidas las muestras, lo cual pudo haber fomentado la germinación de esporas de otros microorganismos menos resistentes.

En cuanto a la proporción de cepas aisladas, se encontró un número mayor en muestras de sedimentos en comparación con aquellos aislados a partir de las muestras de agua (figura 6). La razón de un menor aislamiento en agua se debe a que estos microorganismos se encuentran principalmente en suelos donde tienen los nutrientes necesarios para su crecimiento. Mientras que en hábitats acuáticos pueden sobrevivir, pero en forma de esporas latentes o simplemente no estar activos en ellos; especialmente los ríos llevan una carga moderada de diversas actinobacterias entre ellos *Streptomyces*. Por el contrario, los suelos contienen entre 100 y 1000 cepas diferentes de actinobacterias por gramo (Kampfer, 2006, Seyedsayamdost *et al.*, 2012). En el caso del aislamiento de actinobacterias a partir de sedimentos, la profundidad y el sitio de

muestreo son de gran importancia en la proporción de los distintos taxones de actinobacterias. Okami y Okazaki en 1978 encontraron *Streptomyces* (300-1270 colonias por cm³) en sedimentos marinos poco profundos (70 a 520 m de profundidad), mientras que en muestras tomadas entre 700-1600 m de profundidad el genero *Micromonospora* fue el dominante. A profundidades entre 2800 y 5000 m no se encontraron actinobacterias en el océano pacifico (Kampfer, 2006). Jensen y colaboradores reportaron una distribución bimodal de actinobacterias en ambientes marinos tropicales cercanos a la costa, donde *Streptomyces* es el género predominante a poca profundidad y el número de *Actinoplanes* aislados incrementa al aumentar la profundidad (Jensen *et al.*, 1991). Debido a lo descrito anteriormente, se espera tener dominancia del género *Streptomyces* en los aislamientos.

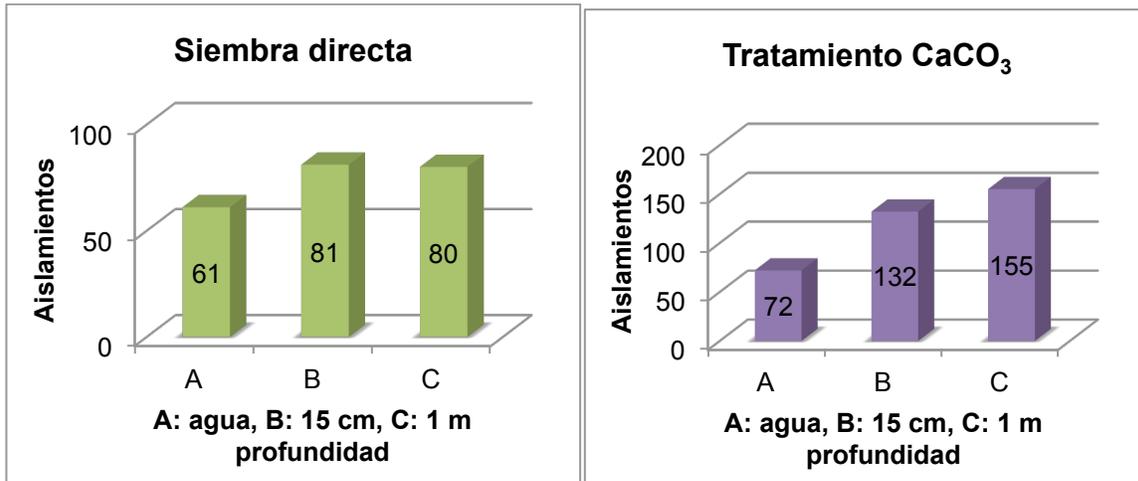


Figura 6. Proporción de cepas de *Actinobacterias* aisladas mediante siembra directa y tratamiento con CaCO₃.

Los aislamientos fueron codificados de la siguiente manera: se asignaron números de 1-5 según el lugar de toma de muestra, las letras A, B y C corresponden a muestras de agua, 15 cm y 1 m de profundidad respectivamente, seguido de números en orden ascendente para las cepas aisladas sin tratamiento y posteriormente fueron enumeradas las cepas aisladas mediante el tratamiento con carbonato de calcio En la figura 7, se muestra a manera de ejemplo el aislamiento secuencial para la cepa 3A-80.

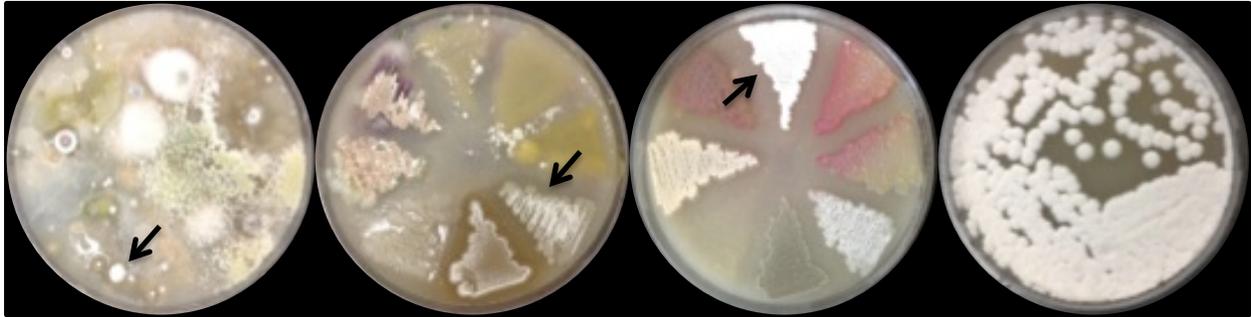


Figura 7. Aislamiento secuencial de la cepa 3A-80 proveniente de muestras sin ningún tratamiento en medio de cultivo ISP3. Cada una de las cajas fue incubada a 30 °C durante 8 días .

Las cepas aisladas presentan una gran diversidad de colores tanto en el micelio aéreo como en el vegetativo, además muchas de ellas producen pigmentos difusibles en el medio o bajo las colonias cuando son cultivadas en el medio ISP3. En la figuras 8 se muestran algunas fotografías de las cepas aisladas.

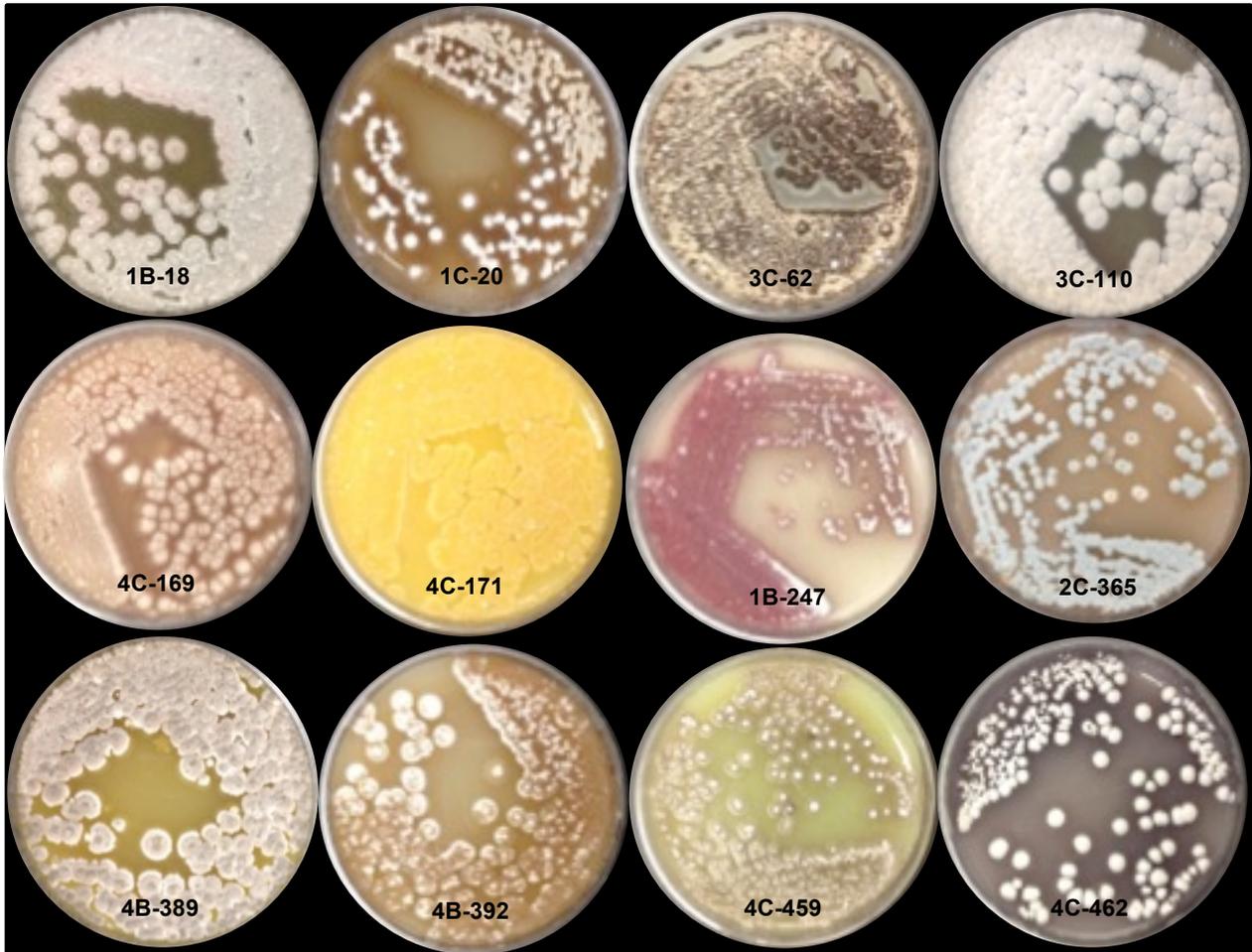


Figura 8. Fotografías de algunas de las cepas aisladas mediante siembra directa y enriquecimiento con CaCO_3 .

Todas las cepas aisladas son Gram positivas, las tinciones de Gram y los análisis morfológicos de las cepas aisladas fueron realizados en dos ocasiones. En la mayoría de las tinciones se pueden observar las hifas con ramificaciones acompañadas de fragmentos en forma de bastón o coco, mientras que en otras sólo se observa la presencia de esporas. La figura 9 muestra algunas de las observaciones microscópicas en la coloración de Gram donde se puede corroborar la presencia de filamentos delgados ramificados (flecha azul), fragmentación de la hifa (flecha verde) y estructuras en espiral (flecha naranja) características de las *Actinobacterias*. Cada uno de los aislamientos fueron agrupados de acuerdo a la coloración del micelio vegetativo y aéreo y la producción de pigmentos en medio de cultivo ISP3, con el fin de tener un acercamiento al número de bacterias aisladas diferentes, en total se obtuvieron 57 grupos de posibles *Actinobacterias* de acuerdo a su morfología macroscópica (anexo 8.2).

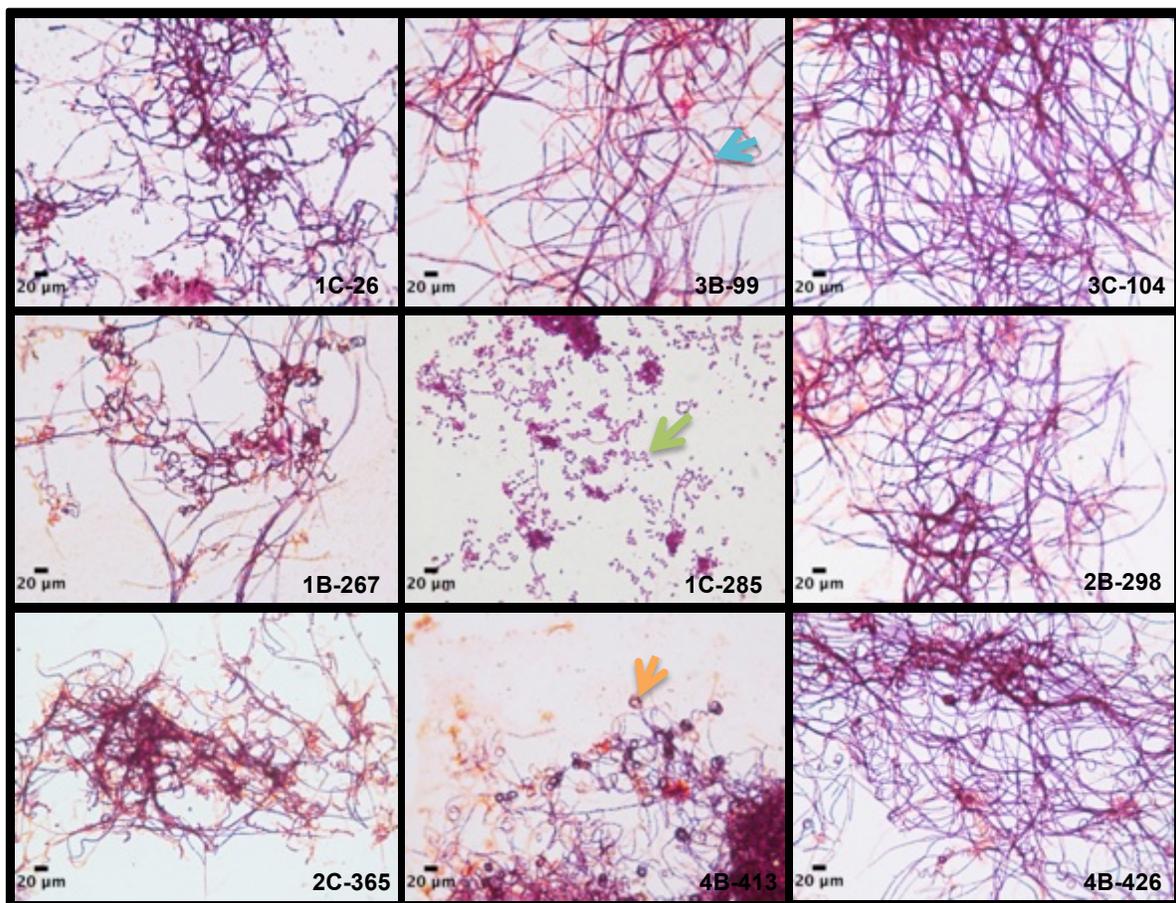


Figura 9. Tinción de Gram de algunas de las cepas aisladas y observadas en el objetivo de 100x.

Mediante las metodologías implementadas se logró obtener un buen número de aislamientos, los cuales hacen parte del biobanco de microorganismos del grupo de investigación en Bioprospección.

5.2. Resultados preliminares de la actividad antimicrobiana mediante enfrentamiento directo

Una vez purificados y conservados, cada uno de los aislamientos fue sometido a pruebas de actividad antibacteriana y antifúngica con el fin de seleccionar aquellos que presentaran un mayor potencial bioactivo.

La actividad antibacterial fue evaluada mediante enfrentamiento directo. Esta metodología es la más usada en ensayos preliminares de actividad antibacterial, ya que permite evaluar un número significativo de bacterias. Tradicionalmente, la actinobacteria se cultiva mediante una línea recta en el centro de la caja y al cabo de varios días de crecimiento, las bacterias patógenas son inoculadas a cada lado de la actinobacteria. Sin embargo, en este estudio la actinobacteria fue sembrada cubriendo un tercio de la caja, lo cual permite una mejor difusión de los compuestos producidos en el agar (Madigan *et al.*, 2012).

De los 374 aislamientos 44 cepas inhibieron el crecimiento de *B. subtilis*, 36 de *S. aureus*, 15 de *E. coli*, 10 de *A. baumannii* y 2 de *K. pneumoniae*. De otro lado, 257 inhibieron la producción de violaceína en *C. violaceum*, evento que es mediado por la comunicación celular y por ello se interpreta como inhibición de *quorum sensing*. En cuanto a la actividad antifúngica 150 de los aislamientos inhibieron el crecimiento de *C. gloeosporioides* 91 de *Fusarium* sp. y 76 de *T. harzianum* (anexo 8.3).

Según los resultados obtenidos, los aislamientos presentaron una mayor actividad antibacterial contra *B. subtilis*, esta bacteria se encuentra presente en suelos y coexiste con actinobacterias especialmente *Streptomyces* (Straight *et al.*, 2006). A pesar de no ser una bacteria patógena para el ser humano es antagonista natural de *Streptomyces*, por lo que se esperaba que esta bacteria fuera la más susceptible a los compuestos producidos por las actinobacterias. Además de esto, la pared celular de *B. subtilis* sólo contiene una capa de peptidoglicano, lo cual la hace más sensible a compuestos antibacterianos (Nikaido & Vaara, 1985). Recientemente, se demostró que una disminución en los niveles

de UppS (Undecaprenil pirofosfato sintasa, una enzima esencial para la biosíntesis de peptidoglicano) hace a esta bacteria ligeramente más susceptible a muchos antibióticos incluyendo los β -lactámicos (Lee & Helmann, 2013). En la mayoría de los casos se presentó inhibición de crecimiento moderada y alta. Los resultados obtenidos se encuentran acorde con la literatura, un estudio realizado en sedimentos marinos en New Jersey reportó el aislamiento de 147 actinobacterias, donde el 46% de las cepas aisladas presentó actividad antibacteriana, siendo la bacteria más susceptible *B. subtilis* (Pisano *et al.*, 1989). En un estudio de actinobacterias en ambientes acuáticos del sur de Chile también se encontró una mayor actividad antagónica contra *B. subtilis*, donde el 37,1% de las cepas aisladas inhibieron esta bacteria (Leiva P *et al.*, 2004). Igualmente, Kamble y colaboradores reportaron mayor actividad contra *B. subtilis*, el 90% de las cepas de *Streptomyces* aisladas de suelos de cultivo de *Curcuma longa* L inhibieron el crecimiento de dicha bacteria (Prabhakar *et al.*, 2015).

La proporción de actinobacterias aisladas con actividad contra *S. aureus* difiere de lo reportado por otros autores, Pisano y colaboradores reportaron que el 50% de las actinobacterias aisladas de sedimentos marinos en New Jersey inhibieron el crecimiento de *S. aureus* (Pisano *et al.*, 1989). Chaudhary y colaboradores reportaron que todas las actinobacterias aisladas de muestras de suelo en Sheopur (India) presentaron actividad contra *S. aureus* (Chaudhary *et al.*, 2013). Mientras que en el presente estudio sólo el 9,6% de las actinobacterias aisladas resultaron ser activas. Este patógeno es causante de infecciones en la piel, y aunque no fue posible utilizar en este proyecto una bacteria meticilina resistente (MRSA), los resultados obtenidos pueden ser el inicio de próximas investigaciones, usando patógenos de mayor relevancia clínica (Cutler & Wilson, 2004). De otro lado, se obtuvo inhibición por parte de 15 aislamientos contra *E. coli*, un enteropatógeno, causante de problemas de salud en humanos (De La Fuente *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos muestran un bajo porcentaje (4%) de actinobacterias con actividad antibacteriana contra este patógeno, lo cual también es reportado por Pisano y colaboradores donde un 5,4% de las actinobacterias aisladas inhibe el crecimiento de *E. coli* (Pisano *et al.*, 1989). Otro estudio indicó que el 7,4% de los aislamientos de actinobacterias presentó actividad antagonista contra este patógeno (Silambarasan *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos muestran un bajo número de aislamientos con actividad antibacteriana contra bacterias Gram negativas como *E. coli*.

Por otra parte, 10 de los aislamientos presentaron actividad antibacterial contra *A. baumannii* un patógeno nosocomial que puede ser causante de infecciones como neumonía, bacteremia, meningitis, infecciones del tracto urinario y de partes blandas (Diomedi P, 2005). *A. baumannii* es endémico en hospitales debido a su capacidad para permanecer en el ambiente por largos periodos y colonizar pacientes, además presenta resistencia a múltiples antibióticos, incluso a los carbapenémicos, utilizados en su tratamiento. Según un estudio del grupo para el control de la resistencia bacteriana de Bogotá (GREBO) hay un significativo incremento en la prevalencia de la resistencia por parte de esta bacteria al imipenem (48,1%) y al meropenem (52%) pertenecientes a la clase de antibióticos betalactámicos carbapenémicos (Yomayusa *et al.*, 2008).

Fueron pocas las bacterias inhibidoras de *K. pneumoniae*, sólo 2 con actividad baja. Sin embargo estos resultados son de gran interés debido a que este patógeno ha sido reportado como el segundo microorganismo aislado en pacientes hospitalizados en Antioquia (GREBO 2009). Debido a su capacidad de producir carbapenemasas inactivan a los antibióticos carbapenémicos, los cuales son la primera opción para su tratamiento, lo cual conlleva a que este patógeno se esté convirtiendo en un problema de salud pública. (Echeverri-Toro *et al.*, 2012). Debido al creciente aumento en la resistencia antibiótica de *A. baumannii* y *K. pneumoniae* a nivel mundial (Perez *et al.*, 2010), se hace necesario continuar en la búsqueda de antibióticos efectivos contra las infecciones causadas por estas bacterias, donde los resultados obtenidos en este estudio indican inhibición de crecimiento de estos microorganismos por parte de las actinobacterias aisladas, especialmente para *A. baumannii*, donde 4 de las 10 cepas activas presentaron inhibición del 70-100%. Aunque sólo 2 de las cepas aisladas tuvieron actividad contra *K. pneumoniae*, el patógeno usado en este estudio es resistente a múltiples antibióticos entre ellos el imipenem, lo cual hace de los resultados de este estudio un aporte significativo para futuras investigaciones. Un estudio de actinobacterias aisladas de suelos de las montañas Quinling y el Himalaya, reportó inhibición de crecimiento del 42,7% de los aislamientos contra *A. baumannii* y 38,5% contra *K. pneumoniae* (Zhu *et al.*, 2014). De igual forma otros estudios con actinobacterias han mostrado actividad antibacterial contra estos dos patógenos (Oskay *et al.*, 2004, Sharma *et al.*, 2011, Chaudhary *et al.*, 2013, Jiao W, 2013, Kumar *et al.*, 2013, Rana & Salam, 2014).

Los resultados del *screening* antibacterial indican que la mayoría de los aislamientos activos fueron aislados de sedimento y en su mayoría se encontró que pertenecían a los puntos de recolección 1 y 4. Además presentan preferente actividad antibacterial contra bacterias Gram positivas, lo cual también se evidencia en otros estudios bioprospectivos con actinobacterias (Pisano *et al.*, 1989, Zhu *et al.*, 2014). Esto podría deberse a las diferencias morfológicas entre bacterias Gram positivas y negativas. Las bacterias Gram negativas tienen una membrana exterior de lipopolisacárido, por lo que su pared celular es impermeable a solutos lipofílicos; al mismo tiempo esta membrana externa actúa como una fuerte barrera permeable frente a muchos antibióticos como: macrólidos, novobiocina, rifamicina, lincomicina y clindamicina, siendo capaces de inactivar pequeñas cantidades de antibióticos. Mientras que, las bacterias Gram positivas solamente tienen una capa de peptidoglicano en su pared celular, la cual no es una barrera permeable efectiva para agentes antibacterianos (Nikaido & Vaara, 1985, Gurung *et al.*, 2009).

En los ensayos iniciales se incluyó la bacteria *C. violaceum* con el fin de observar la inhibición de *quorum sensing*. El *quorum sensing* es un mecanismo de regulación esencial para el control de muchas funciones fisiológicas en bacterias como: división celular, esporulación y secreción de factores de virulencia, entre otras. El *screening* de inhibidores de la comunicación celular es usado actualmente para detectar compuestos que puedan regular la producción de importantes factores de virulencia, como alternativa terapéutica al uso de antibióticos (Zhu *et al.*, 2011). En los resultados 257 de los aislamientos inhiben la producción de pigmento en *C. violaceum* sin alterar el crecimiento de la bacteria, lo cual representa un enorme potencial, ya que la inhibición de *quorum sensing* no interviene directamente en los procesos esenciales para el crecimiento de las bacterias, pero si puede ayudar con la problemática de resistencia antibiótica, pues interrumpe la capacidad de las bacterias para comunicarse y de esta forma puede disminuir su patogenicidad (Zhu *et al.*, 2011). En esta área, las actinobacterias son de gran interés debido a que recientemente se ha reportado su capacidad para producir y secretar enzimas hidrolíticas que actúan como inhibidoras de *N-acil-L-homoserin lactona* compuesto usado por bacterias Gram negativas como señal inductora en *quorum sensing* (Chankhamhaengdech *et al.*, 2013). Igualmente, se obtuvieron 78 resultados positivos de actividad antibacterial contra *C. violaceum* y 13 de las cepas presentaron tanto actividad antibacterial como inhibición de la producción de violaceína en dicha bacteria.

El ensayo de actividad antifúngica se realizó mediante la metodología de difusión en agar, sin embargo se obtuvieron resultados de enfrentamiento directo debido a que el sobrenadante no fue filtrado y las esporas no fueron removidas en su totalidad, lo que junto con el tiempo de incubación favoreció el crecimiento de las actinobacterias. Los resultados de las pruebas antifúngicas muestran un gran potencial por parte de los aislamientos contra hongos fitopatógenos, particularmente contra *C. gloeosporioides*, quien fue inhibido por 150 de los aislamientos. En general, varias actinobacterias pueden ser candidatas potenciales para su uso en agricultura, pues 43 de las cepas aisladas presentaron inhibición de los 3 hongos. Sin embargo, dado que no se realizaron los experimentos necesarios para diferenciar taxonómicamente los aislados, es probable que varias de las cepas con actividad antifúngica pertenezcan a la misma especie.

Las actinobacterias han sido catalogadas como agentes de biocontrol contra hongos fitopatógenos (Sadeghy & Hatami, 2013), siendo la fuente principal de compuestos antifúngicos (Sharma & Parihar, 2010). El uso excesivo de fungicidas químicos en cultivos agrícolas ha generado contaminación ambiental e incremento de resistencia a los fungicidas usados, por lo que se hace necesario el desarrollo de potentes fungicidas ambientalmente amigables y de origen natural, donde las actinobacterias han sido objetivo de estudio. (Kathiresan *et al.*, 2005, Sharma & Parihar, 2010). Diversas especies del género *Fusarium* son consideradas como fitopatógenos, capaces de colonizar plantas y productos agrícolas como: tomate, papa, pino, tabaco y diversos cereales. Sin embargo, también se han presentado casos de patogenicidad en humanos, donde especies de *Fusarium* han sido causantes de infecciones cardíacas, pulmonares, cutáneas e incluso oculares en pacientes inmunodeprimidos (Marín García, 2010). El hongo *Trichoderma harzianum* ha sido reportado como agente limitante en la producción de hongos comestibles (Romero-Arenas *et al.*, 2009) no obstante, también han sido reportados 2 casos de infecciones en humanos producidas por este hongo. El número de pacientes con infecciones causadas por *Trichoderma* spp. tiende a aumentar debido a que ciertas terapias medicas anulan la respuesta inmune del huésped y este hongo hace parte de la microbiota del aire (Guarro *et al.*, 1999).

Por otra parte, los hongos pertenecientes al género *Colletotrichum* han sido catalogados como causantes de enfermedades prácticamente en todas las cosechas agrícolas del mundo. En frutos de aguacate *C. gloeosporioides* es causante de la

enfermedad antracnosis (Rodríguez-López *et al.*, 2013). En Colombia es causante de la antracnosis en cultivos de guanábana (Álvarez *et al.*, 2006), ñame (Pinzón Gutiérrez *et al.*, 2013), cardamomo (Arango *et al.*, 2010) y del árbol de caucho (Medina *et al.*, 2007). Estas investigaciones muestran el gran potencial que presentan las actinobacterias como inhibidoras del crecimiento de hongos no sólo en cultivos agrícolas sino también a nivel clínico, lo cual hace que los resultados obtenidos en el presente trabajo sean relevantes y de interés en diferentes aplicaciones. Igualmente, se destacan los resultados de actividad antibacterial, especialmente los obtenidos para los patógenos *A. baumannii* y *K. pneumoniae*; así como los de inhibición de *quorum sensing* que indican la gran capacidad de las actinobacterias aisladas en la producción de diferentes compuestos bioactivos.

Caracterización y determinación de la actividad antimicrobiana de las cepas seleccionadas con mayor potencial bioactivo

Luego de finalizar la fase de ensayos preliminares, fueron seleccionadas 7 cepas, las cuales presentaron un mayor potencial bioactivo teniendo en cuenta la actividad antibacterial y antifúngica, para ello fueron elegidas aquellas que exhibieron mínimo actividad moderada (++) o alta (+++) contra 1 de los hongos y 2 de las bacterias probadas excluyendo *C. violaceum*.

5.3. Características morfológicas y bioquímicas de las cepas seleccionadas

Una vez seleccionadas las cepas, se procedió a observarlas mediante microscopía electrónica de barrido, con el fin de corroborar las observaciones de tinción de Gram (anexo 8.4), donde también están presentes las características morfológicas de las actinobacterias, especialmente se resaltan los filamentos ramificados, la presencia de esporas y estructuras en espiral (anexo 8.5).

Las características de cultivo de las cepas seleccionadas fueron descritas según su crecimiento y producción de pigmento en agar ISP3 (tabla 5). Las observaciones se realizaron a los 8 días de incubación. Las formas de las cepas seleccionadas son circulares con bordes regulares e irregulares y pocas presentaron pigmentación bajo las colonias, en la tabla 6 son descritas las características de cultivo de cada uno de los aislamientos.

Tabla 6. Características morfológicas de las cepas seleccionadas observadas en el medio ISP3.

Cepa	Características morfológicas de las cepas seleccionadas
1B-239	Beige con blanco circular con bordes regulares y 1 mm de diámetro, sin presencia de pigmento
1B-259	Blanca algodonosa circular con bordes regulares y 5 mm de diámetro, pigmento amarillo claro bajo la colonia
1B-261	Blanca redonda de bordes irregulares con prolongaciones tenues alrededor de la colonia y 4 mm de diámetro, sin presencia de pigmento
1C-32	Café claro redonda de bordes irregulares con prolongaciones tenues alrededor de la colonia, pulverulenta y 5 mm de diámetro, pigmento amarillo claro bajo la colonia
4B-424	Amarilla con centro blanco, circular con bordes irregulares, ligeramente elevada, pigmento amarillo bajo la colonia
4C-159	Café brillante, circular con bordes regulares de 1 mm de diámetro, pigmento amarillo bajo la colonia
5B-194	Café con centro negro y bordes blancos regulares, circular de 3 mm de diámetro, sin presencia de pigmento

Estas características morfológicas también fueron observadas después de 8 días de crecimiento sobre 6 diferentes medios de cultivo, las tablas 7 y 8 muestran los cambios de coloración dependiendo del medio de cultivo usado (anexo 8.6). En general los aislamientos presentaron poco crecimiento en el medio ISP5, mientras que hubo buen crecimiento en el resto de los medios de cultivo usados. En los medios de cultivo ISP1 e ISP5 se formaron colonias mas pequeñas, alrededor de 1 mm de diámetro en comparación a las colonias formadas en los otros medios que alcanzaron hasta 11 mm de diámetro. Se observaron colonias circulares con borde liso y regulares en la mayoría de las cepas, estas colonias al iniciar su crecimiento se tornaron algo brillosas y al pasar los días se volvieron opacas y secas. Las cepas presentaron diferencias en su coloración dependiendo del medio de cultivo usado, en la mayoría de los casos los colores blanco, gris y café en varias tonalidades predominaron, mientras en la parte posterior de las cajas se observaron tonalidades que van desde el beige hasta el naranja. Mientras que en los medios ISP1 e ISP5, algunas de las cepas variaron su coloración a verde claro. Ninguna de las cepas presentó producción pigmentos difusibles en el medio sólido. En diversos estudios también se han evidenciado cambios en las características de cultivo, especialmente en la coloración de actinobacterias según el medio de cultivo usado para su crecimiento (Moncheva *et al.*, 2002, Nanjwade *et al.*, 2010, Baskaran *et al.*, 2011, Kumar *et al.*, 2014).

Tabla 7. Coloración de las cepas seleccionadas en los medios de cultivo ISP1, ISP2 e ISP3, vistas superiores y posteriores.

Cepa	ISP1		ISP2		ISP3	
	Vista superior	Vista posterior	Vista superior	Vista posterior	Vista superior	Vista posterior
1B-239	Blanco	Amarillo claro encendido	Café con blanco	Amarillo claro	Beige	Beige
1B-259	Blanco	Amarillo	Blanco con beige	Amarillo claro	Blanco	Amarillo
1B-261	Blanco	Amarillo	Blanco grisáceo	Amarillo oscuro	Blanco	Beige
1C-32	Café amarillento	Café amarillento	Café grisáceo	Amarillo naranja	Gris con blanco	Amarillo verdoso
4B-424	Amarillo oscuro	Amarillo oscuro	Amarillo con gris	Amarillo	Amarillo con blanco	Amarillo claro
4C-159	Amarillo verdoso	Amarillo oscuro	Café	Amarillo oscuro	Café	Amarillo
5B-194	Gris verdoso	Café verdoso	Café claro	Café	Café con blanco y negro	Café

Tabla 8. Coloración de las cepas seleccionadas en los medios de cultivo ACA, ISP4 e ISP5, vistas superiores y posteriores.

Cepa	ACA		SALES (ISP4)		L-ASPARAGINA (ISP5)	
	Vista superior	Vista posterior	Vista superior	Vista posterior	Vista superior	Vista posterior
1B-239	Café claro grisáceo	Café claro	Café amarillento	Amarillo claro	Blanco	Beige
1B-259	Blanco verdoso	Beige	Blanco pardusco	Amarillo	Blanco con beige	Beige
1B-261	Blanco	Beige	Blanco verdoso	Amarillo fuerte	Blanco	Beige
1C-32	Café grisáceo	Amarillo claro encendido	Morado grisáceo	Beige	Blanco con amarillo	Amarillo
4B-424	Amarillo	Amarillo	Café con blanco	Café	Amarillo claro	Amarillo claro
4C-159	Amarillo cafésoso	Amarillo oscuro	Café grisáceo	Verde	Blanco	Amarillo encendido
5B-194	Café grisáceo	Café verdoso	Negro con bordes beige	Negro	Blanco rojizo	Anaranjado

Posteriormente, se realizó el estudio de consumo de fuentes de carbono (anexo 8.7), donde resultó que las actinobacterias seleccionadas presentan un perfil diferente, pero comparten preferencias por ciertos carbohidratos, lo cual puede indicar que las cepas seleccionadas son especies diferentes. De los azúcares que fueron probados, se encontró que todas las cepas son capaces de asimilar los azúcares glucosa, galactosa y maltosa y en su mayoría la ribosa, xilosa, inositol y fructosa. Por el contrario pocas de ellas, degradan la lactosa y la sacarosa y ninguna la carboximetil celulosa (tabla 9). Los resultados obtenidos difieren de los reportados por Moncheva y colaboradores, quienes

encontraron bastante similitud en los perfiles de asimilación de 15 fuentes de carbono de actinobacterias aisladas de suelos de la Antártida, donde todos los aislamientos crecieron sobre los sustratos: rafinosa, galactosa, ramnosa, ribosa, arabinosa, dextrano, glicerol, manitol, inositol, xantina, tirosina, y elastina; mientras que ninguna creció sobre adonitol, xilitol e isobutanol y las diferencias en los perfiles de asimilación se presentaron en fructosa, xilosa y sacarosa (Moncheva *et al.*, 2002). Otro estudio mostró la capacidad de asimilación del almidón, dextrosa, fructosa, maltosa y manitol por una cepa de *Streptomyces* sp. aislada de sedimentos de las islas Andaman (India) (Baskaran *et al.*, 2011).

Las fuentes de carbono y nitrógeno suministradas son de gran importancia durante la biosíntesis de antibióticos en *Streptomyces*, donde la regulación de la fuente de carbono es uno de los factores principales en el control del metabolismo secundario (Sanchez *et al.*, 2010). Pandey y colaboradores estudiaron el efecto de la fuente de carbono utilizada en la producción de antibióticos, encontrando que la dextrosa es una excelente fuente de carbono para la producción de kanamicina en *Streptomyces kanamyceticus*, mientras la sacarosa y el almidón reportaron los valores más bajo de inhibición antibacterial, posiblemente debido a la rápida utilización de estos compuestos durante el metabolismo primario (Pandey *et al.*, 2005). Otro estudio reportó una máxima producción de antibióticos por *Streptomyces higroscopicus* al usar los azúcares glucosa y lactosa como fuente de carbono y mínima al utilizar ribosa (Ilić *et al.*, 2010).

En las cepas 1B-239, 1B-259, 1C-32 y 4C-159 se observa crecimiento notable en el control negativo, lo cual indica su capacidad de crecimiento probablemente al utilizar dióxido de carbono del ambiente o a causa de presencia de fuente de carbono del pre-inóculo. Prosser y Palleroni reportaron un apreciable crecimiento por parte de algunas cepas de *Streptomyces* en agar mineral sin adición de fuente de carbono; sin embargo, este agar contiene aminoácidos, los cuales suple los requerimientos nutricionales de las actinobacterias (Prosser & Palleroni, 1978).

Tabla 9. Resultados de perfil de fuentes de carbono asimilados por cepas seleccionadas.

Cepa	Glucosa	Lactosa	Galactosa	Maltosa	Ribosa	Sacarosa	Xilosa	Inositol	Fructosa	CMC
1B-239	++	-	+++	+++	++	-	-	+	-	-
1B-259	++	-	+++	+++	++	-	-	+++	++	-
1B-261	++	+	+++	+++	+++	-	++	+++	+	-
1C-32	++	-	+	+++	-	+	-	-	++	-
4B-424	++	-	+	++	++	-	-	+	-	-
4C-159	++	+	++	+++	+++	-	++	-	+	-
5B-194	++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+	+++	-

Crecimiento igual al control negativo (-), crecimiento menor al control positivo (+), crecimiento igual al control positivo (++), crecimiento mayor al control positivo (+++)

La tabla 10 muestra los resultados de sensibilidad antibiótica contra algunos de los antibióticos comúnmente usados contra infecciones bacterianas (anexo 8.8). Todas las actinobacterias presentaron 100% de resistencia contra nitrofurantoina y ampicilina, el 71,4% de las cepas son resistentes a la tetraciclina, mientras que sólo el 28,5% presentó resistencia a la kanamicina y ninguna a la gentamicina. Los resultados obtenidos en el presente estudio son similares a los reportados por Kamble y Kulkarni, quienes reportaron que todas cepas aisladas de suelos de cultivo de *Curcuma longa* L. presentaron sensibilidad a los antibióticos gentamicina y estreptomina, en su mayoría fueron resistentes a cloranfenicol y algunas a la penicilina y tetraciclina (Kamble & Kulkarni, 2012). La actinobacteria *Streptomyces* sp. SCA7 también fue sensible a la gentamicina, sin embargo difirió de los resultados acá obtenidos en los antibióticos ampicilina y tetraciclina (Kumar *et al.*, 2014).

Un estudio reportó que *Actinobacterias* con múltiple resistencia a antibióticos de tipo aminoglucósido presentan una alta probabilidad de producción de antibióticos de este tipo, cuyos patrones de resistencia son específicos para cada cepa, lo que constituye un tipo selectivo de aislamiento dirigido basado en la resistencia antibiótica. En este mismo estudio se determinó que la cepa *Streptomyces kanamyceticus* quien produce kanamicinas presentó un perfil de resistencia contra estreptomina, kanamicina y ribostamicina. La cepa *Micromonospora* sp. SS-1853, productora de gentamicinas es resistente a los antibióticos: kanamicina, gentamicina e istamicina (Hotta & Okami, 1996). Con base en el estudio mencionado anteriormente, se puede concluir que los compuestos antimicrobianos responsables de las actividades reportadas en este estudio posiblemente no pertenecen a antibióticos tipo aminoglucósido, pues sólo 2 de las cepas son resistentes a la kanamicina y ninguna a la gentamicina.

Tabla 10. Resultados de resistencia antibiótica para las cepas seleccionadas.

Cepa	<i>Gentamicina</i>	<i>Nitrofurantoína</i>	<i>Kanamicina</i>	<i>Tetraciclina</i>	<i>Ampicilina</i>
1B-239	-	+	+	+	+
1B-259	-	+	+	+	+
1B-261	-	+	-	+	+
1C-32	-	+	-	-	+
4B-424	-	+	-	+	+
4C-159	-	+	-	+	+
5B-194	-	+	-	-	+

+: Resistente, crecimiento de la *Actinobacteria*, -: sensible

Los resultados obtenidos de caracterización morfológica y bioquímica muestran la diversidad en cuanto a la morfología, crecimiento y tamaño de las cepas en diferentes medios de cultivo, así como su capacidad para asimilar diferentes fuentes de carbono y resistencia antibiótica. Estos resultados, además de permitir un mayor conocimiento de las características microscópicas, macroscópicas y bioquímicas de los aislamientos, también pueden ser usados como complemento a la identificación molecular siendo fuente de comparación en caso de problemas de clasificación taxonómica.

5.4. Identificación molecular de las cepas seleccionadas

Con el fin de identificar molecularmente los aislamientos, se procedió a realizar extracción de DNA, el cual fue amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), obteniéndose un amplicon de aproximadamente 1500pb. Los resultados se muestran en la figura 10.

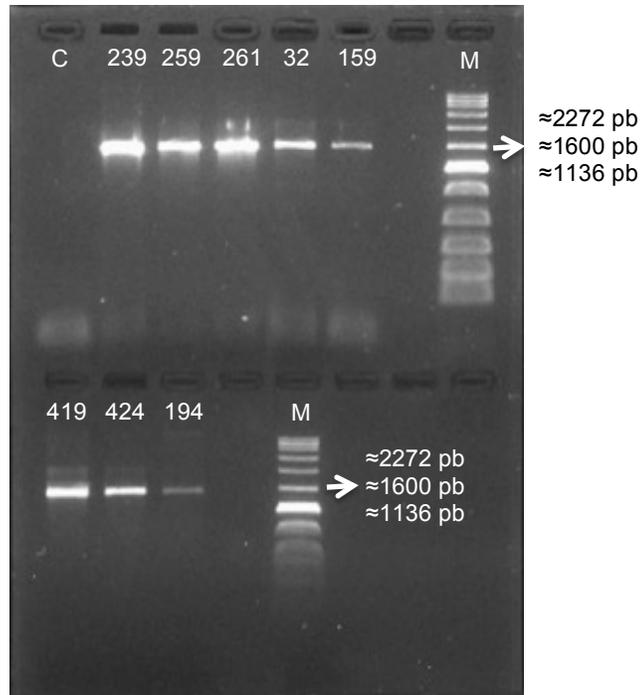


Figura 10. Amplificación por PCR de la región 16S rRNA de las 8 cepas , C (control negativo) M (marcador) Q biogene Leon Marker.

Las secuencias del gen 16S rRNA de cada uno de los oligonucleótidos usados (27F, 518F, 800R y 1492R) fueron ensambladas usando el programa CLC main workbench y cada uno de los contigs fue comparado con la base de datos LTP 109 SILVA Living Tree Project. Esta base de datos alberga todas las secuencias de cepas tipo de las especies de archaea y bacterias que hasta el momento han sido clasificadas junto con los nombres validados por la Revista Internacional de Microbiología Sistemática y Evolutiva (Yarza *et al.*, 2008). En la tabla 11 se encuentran los resultados del análisis de las secuencias mediante la base de datos mencionada anteriormente.

Tabla 11. Identificación molecular de las cepas seleccionadas mediante secuenciación del gen 16S rRNA.

SILVA Living Tree Project 109			
Cepa	bp	Nombre	% similitud
1B-239	1341	<i>Streptomyces lunalinharesii</i>	99,33
1B-259	1126	<i>Streptomyces kasugaensis</i>	98,59
		<i>Streptomyces celluloflavus</i>	98,58
1B-261	1060	<i>Streptomyces albospinus</i>	99,71
1C-32	1084	<i>Kitasatospora putterlickiae</i>	98,53

4B-424	1115	<i>Streptomyces variegatus</i>	98,57
		<i>Streptomyces flavofungini</i>	98,21
4C-159	1318	<i>Streptomyces griseofuscus</i>	99,92
		<i>Streptomyces murinus</i>	99,92
		<i>Streptomyces costaricanus</i>	99,92
5B-194	1146	<i>Streptomyces misionensis</i>	99,30
		<i>Streptomyces phaeoluteichromatogenes</i>	99,02

Posteriormente, fue realizado el árbol filogenético utilizando el algoritmo Máxima parsimonia como estrategia de agrupamiento (figura 11).

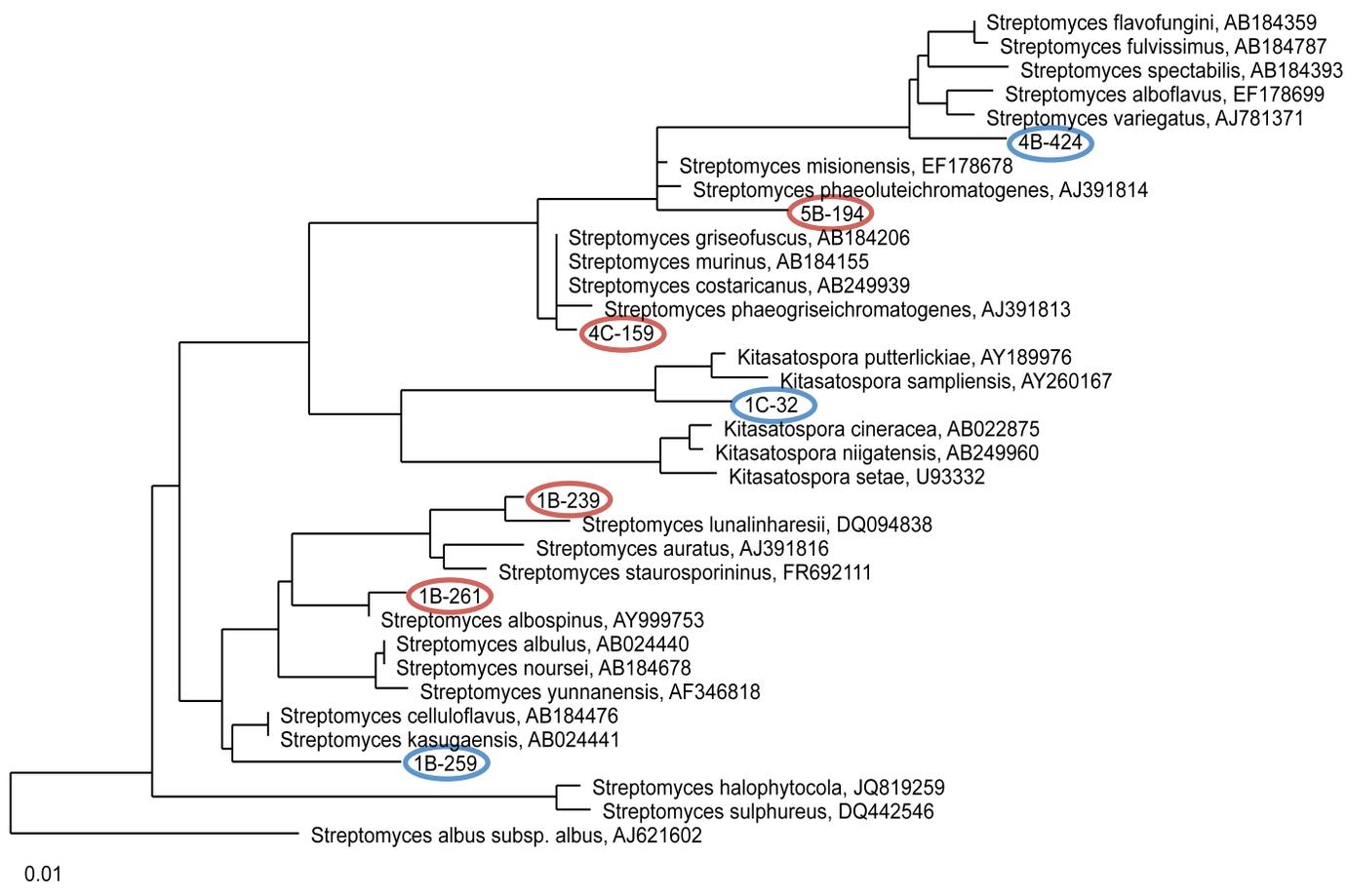


Figura 11. Árbol filogenético de las cepas seleccionadas usando como estrategia de agrupamiento Máxima Parsimonia.

El límite más reciente de circunscripción de una especie procariota está determinado en un porcentaje de similitud de mínimo 98,7% (Yarza *et al.*, 2014). Las cepas 1B-259, 1C-32 y 4B-424 están por debajo de este valor, lo cual podría sugerir que estas cepas posiblemente son especies nuevas, además en los árboles filogenéticos, se puede observar que estos aislamientos se encuentran dentro del clado en una rama aparte y más distantes en comparación a las otras bacterias.

La cepa 1B-239 fue identificada como *S. lunalinharesii* con 99,33% de similitud. *S. lunalinharesii* comparte las características morfológicas reportadas en los medios de cultivo ISP4 e ISP5 con los resultados obtenidos en este estudio (de Souza *et al.*, 2008). Se ha reportado que *S. lunalinharesii* presenta actividad antimicrobiana contra *Aspergillus niger* y *Candida albicans* (de Souza *et al.*, 2008) *Bacillus pumilus* y *Desulfovibrio alaskensis* (Pacheco da Rosa *et al.*, 2013). *S. lunalinharesii* exhibe fuerte actividad sobre diversos hongos fitopatógenos (Gomes *et al.*, 2001, Macrae *et al.*, 2013)

La cepa 1B-259 fue identificada como *S. kasugaensis* con un porcentaje de similitud de 98,59% y *S. celluloflavus* con similaridad de 98,58%. *S. kasugaensis* presenta similitudes morfológicas muy cercanas a los resultados obtenidos para la bacteria 1B-259, en cuanto a su coloración en los medios de cultivo ISP2 ISP3, ISP4 e ISP5, perfil de consumo de fuentes de carbono y estructuras en espiral observadas en microscopía electrónica de barrido, sin embargo debido al bajo porcentaje de similitud es probable que esta cepa corresponda a una especie nueva (Hamada *et al.*, 1995, Whitman *et al.*, 2012). *S. kasugaensis* es conocido como productor de kasugamicina, un antibiótico tipo aminoglucósido efectivo contra *Pyricularia oryzae* que es usado en agricultura (Ikeno *et al.*, 2002). Este antibiótico, también bactericida actúa como inhibidor de la biosíntesis de proteínas en microorganismos (Sharma, 2014).

La cepa 1B-261 fue identificada como *S. albospinus* con un porcentaje de 99,71% de similitud. Esta bacteria es productora del fungicida fenamida, el cual inhibe el crecimiento de *Stagonospora nodorum*, causante del tizón de la gluma en el trigo (Makkar *et al.*, 1995). En 2011 fueron elucidados tres nuevos compuestos del caldo de fermentación de *S. albospinus* (Yu *et al.*, 2011). En 2013 dos nuevos sesquiterpenos fueron aislados de *S. albospinus*, los cuales inhiben el crecimiento de *S. aureus* meticilina resistente (Yu *et al.*, 2013).

La cepa 1C-32 se identificó como *K. putterlickiae* con 98,53% de similitud. La bacteria *K. putterlickiae* presenta similitudes en la coloración en los medios de cultivo ISP2, ISP3 e ISP4, al igual que el perfil de consumo de sustrato (Groth *et al.*, 2003). Una búsqueda en las bases de datos Isi Web of Science y Scopus indican que hasta el momento no han sido publicados estudios donde se reporte alguna bioactividad por parte de esta bacteria, lo cual es de gran importancia, pues sería el primer estudio en hacer este tipo de reporte, sin embargo, los resultados de secuenciación podrían sugerir que se trata de una especie nueva.

La cepa 4B-424 fue identificada como *S. variegatus* con 98,57% de similitud y *S. flavofungini* con un porcentaje de identidad de 98,21%. Algunas de las características morfológicas descritas para estas dos bacterias no concuerdan con los resultados obtenidos, al igual que el perfil de consumo de fuente de carbono, donde hay diferencias en la asimilación de xilosa y fructosa, por lo que posiblemente podría ser considerada como una especie nueva, debido al porcentaje de similitud por debajo de 98,7%

La cepa 5B-194 fue identificada como *S. misionensis* con 99,56% y *S. phaeoluteichromatogenes* con 99,46% de similitud. Los perfiles de consumo de fuente de carbono de la bacteria *S. phaeoluteichromatogenes* difieren con los resultados obtenidos para la cepa 5B-194, al igual que la coloración en los medios ISP2, ISP3, ISP4 e ISP5 (Goodfellow *et al.*, 2007), mientras que la coloración y el consumo de fuentes de carbono de *S. misionensis* se encuentra acorde a lo encontrado para la cepa 5B-194 (Elwood *et al.*, 1969), por lo que es más probable que este aislamiento corresponda a esta bacteria, sin embargo no es posible asegurarlo debido a los resultados de similaridad tan cercanos. *S. misionensis* es productor de un antibiótico llamado misionina, el cual tiene actividad contra hongos fitopatógenos incluyendo *Helminthosporium* y *Alternaria* (Franco-Cirigliano *et al.*, 2013)

La cepa 4C-159 presenta similitud de 99,92% con 3 actinobacterias diferentes: *S. murinus*, *S. costaricanus* y *S. griseofuscus*, debido a estos resultados de similaridad no fue posible discriminar con certeza a que especie corresponde este aislamiento. En actinobacterias el análisis del gen 16S generalmente permite identificar solo hasta nivel de género (Sharma, 2014). Se ha encontrado que el uso del gen 16S es una herramienta

conveniente para la delimitación de especies en *Streptomyces*, pero no para la diferenciación entre cepas, debido principalmente al gran número de especies descritas (aproximadamente 3000), gracias al potencial bioactivo de este género. Esto ha ocasionado problemas de sobre clasificación, donde muchas de las especies de *Streptomyces* son consideradas bacterias sinónimo (Anderson & Wellington, 2001). Por lo que sería necesario combinar otras técnicas que permitan la identificación completa de esta bacteria como quimiotaxonomía, la cual se basa en la identificación de varios constituyentes de la célula bacteriana que permitan su clasificación, como el análisis de la composición química de la pared celular, fagotipificación, ensayos bioquímicos, perfil de ácidos grasos y proteínas, entre otros. Otra herramienta usada en la caracterización taxonómica es la tipificación multilocus de secuencias (MLST), una técnica que usa la heterogeneidad de fragmentos internos de varios genes de mantenimiento y mide los cambios en la secuencia de dichos genes. La hibridación DNA-DNA es otra técnica útil, que permite establecer el grado de similitud entre dos genomas. (Anderson & Wellington, 2001, Vinchira, 2014).

En cuanto a las cepas 5B-194 y 4C-159, las cuales presentaron problemas de clasificación, se hace necesario utilizar alguna de las metodologías anteriormente mencionadas como tipificación multilocus de secuencias (MLST) para poder establecer con exactitud la especie a la cual pertenecen, pues es difícil determinarlo basándose en la secuencia del gen 16S y en las características morfológicas y bioquímicas, tal como se evidencio en el presente estudio. Los resultados obtenidos para los aislamientos 1B-259, 1C-32 y 4B-424, sin duda alguna son de gran interés al ser considerados como posibles nuevas especies, lo cual sería una enorme contribución al conocimiento de la microbiota de esta región del país e incentivo para nuevas investigaciones. Para estas posibles nuevas especies se tendrían que llevar a cabo un conjunto de experimentos donde se evalúen mas a fondo sus características fisiológicas, bioquímicas, fenotípicas y quimiotaxonómicas, así como el uso de herramientas moleculares como tipificación multilocus de secuencias (MLST) e hibridación DNA-DNA para poder diferenciarlas de sus vecinos mas cercanos (Hamedi *et al.*, 2011).

5.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las cepas seleccionadas

En la tabla 12 son mostrados los resultados preliminares de actividad antimicrobiana para las cepas elegidas, estos resultados sugieren que 5 de las 7 cepas seleccionadas

podrían producir más de un compuesto antibacterial, lo que las hace inhibitoras de bacterias Gram positivas y Gram negativas al mismo tiempo (anexos 8.4 y 8.5).

Tabla 12. Resultados de actividad antimicrobiana para las 7 cepas seleccionadas.

Cepa	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>C. gloeosporioides</i>
1B-239	+++	+	-	-	-	++	+++	+++
1B-259	++	+++	++	+++	-	+	-	+++
1B-261	-	+++	-	++	-	+	++	+++
1C-32	++	-	++	++	-	-	-	++
4B-424	-	++	-	++	-	-	-	++
4C-159	+	+++	+++	+++	-	+	-	+++
5B-194	-	-	++	++	-	++	+	+++

+++: actividad alta, ++: actividad moderada, +: actividad baja, -: no actividad. Prueba antibacterial +++ (inhibición 75-100%), ++ (inhibición 50%), + (inhibición 25%). Prueba antifúngica +++ (diámetro de inhibición >20 mm), ++ (10-20 mm), + (<10 mm)

El segundo ensayo de actividad antimicrobiana se realizó mediante difusión en agar usando los sobrenadantes de los cultivos, tal como se realizó el ensayo preliminar para la actividad antifúngica. Sin embargo, esta metodología no arrojó ningún resultado positivo. Al realizar los cultivos en 10 mL de caldo ISP2 y usar este sobrenadante para los ensayos, los compuestos producidos por las actinobacterias podrían no estar presentes en la cantidad necesaria para ser detectados, por lo que se procedió a liofilizar dichos sobrenadantes con el fin de concentrar aquellos compuestos antimicrobianos. Los liofilizados fueron resuspendidos en 500 µL de agua estéril y utilizados en los ensayos de actividad antimicrobiana; no obstante los resultados fueron negativos para la actividad antibacterial y en el caso de los hongos hubo crecimiento por parte de la actinobacteria por lo que se presentó un enfrentamiento directo igual que en los ensayos preliminares mostrando resultados positivos de inhibición.

Se prosiguió con la realización del ensayo antimicrobiano mediante extracción con disolvente, donde el caldo de fermentación con las células fue sometido a extracción con acetato de etilo 2 veces, luego de permanecer en contacto durante 2 días en constante agitación. Sin embargo solo la cepa 4C-159 presentó actividad únicamente contra *B. subtilis* al usar los extractos de los dos medios de cultivo utilizados, con un diámetro de inhibición de 22 mm y 20 mm para los medios ISP2 y MH respectivamente, los cuales superan el diámetro del control positivo, que para este caso fue de 18 mm con rifampicina. Estas diferencias entre los resultados obtenidos por enfrentamiento directo y difusión en agar pueden estar relacionadas con el cambio en la morfología de la bacteria

dependiendo de su medio de crecimiento. Se ha encontrado que *Actinobacterias* del género *Streptomyces* producen antibióticos cuando crecen en medio de cultivo sólido, donde se presenta un crecimiento de micelio filamentososo, mientras que en medio líquido el micelio se fragmenta debido a la agitación, lo cual impide la producción de antibióticos (Pickup *et al.*, 1993). También puede estar relacionado con modificaciones químicas de los compuestos activos, que en medio líquido se vuelven inactivos (Gurung *et al.*, 2009). Otra posible explicación puede ser la falta de competencia directa por parte de los otros microorganismos, lo que hace que la actinobacteria no tenga la necesidad de producir compuestos antimicrobianos o no en la cantidad suficiente para ser detectados. Además de esto, la producción de compuestos antimicrobianos en medio líquido es dependiente de las condiciones de crecimiento de la bacteria, las cuales pudieron no satisfacerse durante el experimento, por lo que sería necesario evaluar cada uno de los siguientes factores: el pH, la temperatura, la agitación, el tiempo de incubación y el uso de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno (Vijayakumar *et al.*, 2012). Otra posible razón por la cual no se obtuvieron los mismos resultados reportados en la prueba de enfrentamiento directo puede estar relacionado con la cantidad de extracto crudo usado en la prueba. Rana y Salam reportaron que la concentración mínima inhibitoria de extracto crudo (acetato de etilo) para una cepa de *Streptomyces* se encuentra en el rango de 0,15 a 5 mg/mL (Rana & Salam, 2014). Mientras que Saravana Kumar y colaboradores llevaron a cabo el experimento de actividad antibacteriana con 5 mg de extracto crudo por disco (Kumar *et al.*, 2014). De igual manera, la concentración de extracto necesaria para inhibir el crecimiento varía según el patógeno a evaluar, al igual que la producción del antimicrobiano por parte de la actinobacteria, por lo que es posible que la concentración de los extractos de la cepa 4C-159 estuvieran dentro del rango de acción para *B. subtilis* y no para las demás bacterias evaluadas. En el ensayo llevado a cabo se agregaron 0,5 mg de extracto por pozo, por lo que sería necesario realizar cultivos de mayor tamaño con el fin de obtener mayor cantidad de extracto, pues en cultivos de 10 mL se obtuvieron entre 3 y 5 mg dependiendo de la cepa.

Otro factor importante está relacionado con la producción de compuestos antimicrobianos extracelulares e intracelulares, aunque en la mayoría de los casos, los antibióticos han sido reportados como compuestos extracelulares (Ramani & Kumar, 2012), también han sido hallados intracelularmente (Moncheva *et al.*, 2002, Pandey *et al.*, 2011, Bhat *et al.*, 2013). En un estudio realizado por Saravana Kumar y colaboradores se

demonstró la influencia del medio de cultivo en la producción de metabolitos secundarios intracelulares, ya que al evaluar diferentes medios de cultivo líquidos, sólo el medio nutritivo con glucosa modificado (MNGA) mostró resultados similares a los obtenidos mediante la metodología de enfrentamiento directo (Kumar *et al.*, 2014), por lo que también sería necesario evaluar la actividad antimicrobiana de cada una de las cepas en diferentes medios de cultivo usando extractos intracelulares y extracelulares.

Además de las razones expuestas anteriormente, la no detección de la actividad antimicrobiana a partir de los extractos puede ser debido a que muchos de los metabolitos secundarios probablemente son de naturaleza apolar hidrofóbica o altamente polares y el uso de acetato de etilo permite la extracción de compuestos de polaridad intermedia y relativamente alta (Sarker *et al.*, 2005).

Aunque se obtuvieron unos muy buenos resultados de actividad antimicrobiana por enfrentamiento directo, no fue posible extrapolar los mismos resultados utilizando un extracto crudo de acetato de etilo, por lo que este punto es materia de estudio para futuros proyectos.

Es de resaltar que en este trabajo de investigación se desarrollaron e implementaron técnicas de aislamiento de actinobacterias por primera vez en el laboratorio de Bioprospección de la Universidad de La Sabana, lo cual permitió el aislamiento de un número significativo de actinobacterias que presentaron actividad antibacterial y/o antifúngica. Las cepas seleccionadas con mayor actividad antimicrobiana en su mayoría pertenecen a especies del género *Streptomyces*, lo cual se encuentra en concordancia con otros estudios realizados en sedimentos de fuentes acuáticas de agua dulce, donde el género predominante es *Streptomyces* (Pisano *et al.*, 1987, Ellaiah *et al.*, 2002, Rifaat, 2003, Leiva P *et al.*, 2004, Gebreyohannes *et al.*, 2013). Con base en la identificación molecular de las cepas se determinó que 3 de ellas son posibles nuevas especies, lo cual promueve la continuidad de estudios bioprospectivos en hábitats aún no explorados especialmente en el país. Según un estudio realizado por Yarsa y colaboradores se estima que los 2000 géneros de bacteria y archaea que han sido descritos constituyen aproximadamente sólo el 2% de los géneros que pueden existir (Yarza *et al.*, 2014).

Las bacterias identificadas como *S. lunalinharesii*, y *S. albospinus* han sido reportadas principalmente como inhibidores de hongos fitopatógenos, por lo que sería atractivo continuar con su estudio, ya que podrían ser fuente de inoculantes biológicos para uso agrícola en el país. Contrario a lo reportado para la mayoría de los aislados identificados y para los vecinos más cercanos de las cepas con problemas de clasificación que se destacan por su actividad antagónica contra hongos, los resultados de esta investigación indican que todas ellas presentan actividad antibacteriana y antifúngica, lo cual es de gran importancia e interés para futuras investigaciones, ya que debido al hábitat de aislamiento y las posibles interacciones ecológicas, éstas podrían presentar diferencias metabólicas con respecto a las bacterias identificadas. Además de esto, los resultados obtenidos son promisorios y constituyen un primer acercamiento en cuanto al gran potencial bioactivo y taxonómico de las actinobacterias aisladas en el río Guaviare.

Este estudio hace parte del proyecto: “Construcción de un Repositorio de Actinomicetos y Hongos Acuáticos de los Ríos Amazonas y Guaviare y una Librería de Extractos Microbianos con Fines Bioprospectivos” y su financiación fue asumida por la Universidad de La Sabana.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1. Conclusiones

El presente estudio reportó el aislamiento de un número importante de actinobacterias provenientes de muestras de agua y sedimentos de las riberas del río Guaviare mediante siembra directa y enriquecimiento con carbonato de calcio, además del uso de medios de cultivo selectivos; donde el tratamiento con carbonato de calcio resultó ser el método más efectivo para el aislamiento de actinobacterias. Se puede concluir que los sedimentos acuáticos del río Guaviare constituyen un reservorio de actinobacterias con gran capacidad de producción de compuestos antimicrobianos, las cuales presentaron una fuerte inhibición contra hongos fitopatógenos, el 40,1% de los aislamientos presentó actividad antifúngica contra *C. gloeosporioides*, el 24,3% contra *Fusarium* sp. y el 20,3% contra *T. Harzianum*. Además de esto, el 11,5% de los aislamientos inhibieron el crecimiento de los tres hongos, lo cual los constituye como posibles candidatos en estudios posteriores para su uso como biocontroladores en diferentes cultivos agrícolas. Aunque las actinobacterias aisladas presentaron un mayor potencial como inhibidoras de hongos fitopatógenos en comparación a su actividad antibacteriana, también se obtuvieron buenos resultados antibacteriales, donde se observó una clara inclinación hacia la inhibición de bacterias Gram positivas, el 11,8% de los aislamientos inhibió el crecimiento de *B. subtilis*, el 9,6% de *S. aureus*, el 4,0% de *E. coli*, el 2,7% de *A. baumannii* y el 0,5% de *K. pneumoniae*. De otro lado, se obtuvo una fuerte inhibición de *quorum sensing* por parte del 68,7% de los aislamientos, lo cual las cataloga como una fuente promisoriosa muy atractiva de posibles compuestos capaces de inhibir o disminuir la patogenicidad de bacterias que tienen la capacidad de formar biopelículas como mecanismo de resistencia antibiótica.

Inicialmente, fueron seleccionadas 8 cepas para su caracterización y determinación de actividad antimicrobiana mediante difusión en agar, sin embargo durante el proceso una fue descartada debido a problemas de contaminación con bacterias Gram negativas. Mediante la identificación molecular de las cepas que presentaron un mayor espectro antimicrobiano, se logró determinar que todas pertenecen a la familia *Streptomycetaceae*, las cuales fueron clasificadas en diferentes clados, tres de ellas presentaron bajo porcentaje de similitud (< 98.7%), sugiriendo que son posibles especies nuevas. Los resultados obtenidos en el presente estudio se destacan al reportar un número importante

de bacterias con capacidad de producción de compuestos antimicrobianos, lo cual hace que estas bacterias sean de gran interés para estudios posteriores, donde se evalúen sus capacidades para producir compuestos con potencial biológico.

Es de resaltar que este es un estudio pionero acerca de actinobacterias cultivables de sedimentos y agua del río Guaviare, los cuales pueden ser una reserva aún sin explorar de la diversidad biológica y química, la cual puede representar un sin número de aplicaciones como agentes biológicos.

6.2. Recomendaciones

- Teniendo en cuenta los problemas de contaminación que se presentaron durante el aislamiento y el establecimiento de los cultivos axénicos, se recomienda combinar el tratamiento de carbonato de calcio con otras metodologías que permitan disminuir la flora acompañante y favorecer el crecimiento de actinobacterias. Además de incluir pre-tratamientos enfocados al enriquecimiento de las muestras en actinobacterias raras.
- Dado que no fue posible evaluar la actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos multiresistentes, se recomienda realizar estos ensayos de tamizaje únicamente con las bacterias que presentaron alguna actividad biológica con el fin de determinar la capacidad de estas actinobacterias para producir nuevos antibióticos.
- Debido a que no se logró evaluar la actividad antimicrobiana por completo en las cepas elegidas mediante difusión en agar, se propone realizar estudios donde se evalúen diferentes medios de cultivo, temperaturas, pH, agitación y tiempos de crecimiento de las actinobacterias, así como la preparación de extractos intracelulares y extracelulares con disolventes de diferentes polaridades para la obtención de los metabolitos responsables de la bioactividad.
- Se recomienda realizar análisis de promoción de crecimiento vegetal de aquellos aislamientos con predominante actividad antifúngica para su posible uso como inoculantes biológicos.
- Se recomienda realizar otros estudios a nivel molecular para establecer la clasificación taxonómica de las cepas que no fueron identificadas mediante la secuenciación del gen 16S para establecer si efectivamente se tratan de nuevas especies.

7. Bibliografía

- Allgaier M & Grossart H-P (2006) Diversity and Seasonal Dynamics of Actinobacteria Populations in Four Lakes in Northeastern Germany. *Applied and environmental microbiology* **72**: 3489-3497.
- Álvarez E, Ospina CA, Mejía JF & Llano GA (2006) Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en guanábana (*Annona muricata*) en el valle del Cauca. *Fitopatología Colombiana* **28**.
- Anderson AS & Wellington EM (2001) The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **51**: 797-814.
- Angert ER (2005) Alternatives to binary fission in bacteria. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 214-224.
- Arango SS, Hoyos R & Afandor L (2010) Actividad fitotóxica del filtrado crudo de *Colletotrichum gloeosporioides* en cardamomo (*Elettaria cardamomum*). *Revista Tecnológicas* **24**: 40-57.
- Baskaran R, Vijayakumar R & Mohan PM (2011) Enrichment method for the isolation of bioactive actinomycetes from mangrove sediments of Andaman Islands, India. *Malaysian Journal of Microbiology* **7**: 26-32.
- Berdy J (2005) Bioactive microbial metabolites. *Journal of Antibiotics (Tokyo)* **58**: 1-26.
- Bhat SA, Nazir R, Malik TA & Shah FA (2013) Secondary metabolites of actinomycetes as potential source of antibiotics. *Stem cell* **4**: 41-46.
- Bull AT & Stach JE (2007) Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Trends in microbiology* **15**: 491-499.
- Cardona GI, Arcos AL & Murcia UG (2005) Abundancia de actinomicetos y micorrizas arbusculares en paisajes fragmentados de la Amazonia colombiana. *Agronomía Colombiana* **23**: 317-326.
- Cardona GI, Peña-Venegas CP & Ruiz-García M (2009) Comunidades de hongos actinomicetos en tres tipos de vegetación de la Amazonia colombiana: abundancia, morfotipos y el gen 16s ADNr. *Revista de Biología Tropical* **57**: 1119-1139.
- Chankhamhaengdecha S, Hongvijit S, Srichaisupakit A, Charnchai P & Panbangred W (2013) Endophytic Actinomycetes: A Novel Source of Potential Acyl Homoserine Lactone Degrading Enzymes. *BioMed Research International* **2013**: 8.
- Chaudhary HS, Yadav J, Shrivastava AR, Singh S, Singh AK & Gopalan N (2013) Antibacterial activity of actinomycetes isolated from different soil samples of Sheopur (A city of central India). *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* **4**: 118-123.
- Cross T (1981) Aquatic Actinomycetes: A Critical Survey of the Occurrence, Growth and Role of Actinomycetes in Aquatic Habitats. *Journal of Applied Bacteriology* **50**: 397-423.
- Cutler RR & Wilson P (2004) Antibacterial activity of a new, stable, aqueous extract of allicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *British journal of biomedical science* **61**: 71-74.
- De La Fuente R, Sonawane ND, Arumainayagam D & Verkman AS (2006) Small molecules with antimicrobial activity against *E. coli* and *P. aeruginosa* identified by high-throughput screening. *British journal of pharmacology* **149**: 551-559.
- de Lima Procópio RE, da Silva IR, Martins MK, de Azevedo JL & de Araújo JM (2012) Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* **16**: 466-471.

- de Souza RF, Coelho RR, Macrae A, Soares RM, Nery Dda C, Semedo LT, Alviano CS & Gomes RC (2008) *Streptomyces lunalinharesii* sp. nov., a chitinolytic streptomycete isolated from cerrado soil in Brazil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **58**: 2774-2778.
- Demain AL & Sanchez S (2009) Microbial drug discovery: 80 years of progress. *Journal of Antibiotics (Tokyo)* **62**: 5-16.
- Diomedi P A (2005) Infecciones por *Acinetobacter baumannii* pan-resistente: Consideraciones epidemiológicas y de manejo antimicrobiano actualizado. *Revista chilena de infectología* **22**: 298-320.
- Duncan K, Haltli B, Gill KA & Kerr RG (2014) Bioprospecting from marine sediments of New Brunswick, Canada: exploring the relationship between total bacterial diversity and actinobacteria diversity. *Marine Drugs* **12**: 899-925.
- Echeverri-Toro LM, Rueda ZV, Maya W, Agudelo Y & Ospina S (2012) *Klebsiella pneumoniae* multi-resistente, factores predisponentes y mortalidad asociada en un hospital universitario en Colombia. *Revista chilena de infectología* **29**: 175-182.
- Eiler A & Bertilsson S (2004) Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Environmental Microbiology* **6**: 1228-1243.
- El-Sayed MH (2012) Di-(2-ethylhexyl) Phthalate, a Major Bioactive Metabolite with Antimicrobial and Cytotoxic Activity Isolated from the Culture Filtrate of Newly Isolated Soil *Streptomyces* (*Streptomyces mirabilis* Strain NSQu-25). *World Applied Sciences Journal* **20**: 1202-1212.
- Elamvazhuthi P & Subramanian M (2013) Antagonistic Activity of Actinomycetes from Jeypore Paddy Soils against Selective Phytopathogenic Fungi. *Journal of Modern Biotechnology* **2**: 66-72.
- Ellaiah P, Raju KV, Adinarayana K, Adinarayana G, Saisha V, Madhavi S & Premkumar J (2002) Bioactive actinomycetes from Krishna River sediments of Andhra Pradesh. *Hindustan antibiotics bulletin* **44**: 8-16.
- Elwood B, Gottlieb D & Gottlieb S (1969) Cooperative description of type cultures of streptomycetes. IV. Species descriptions from the second, third and fourth studies. *International Journal of Systematic Bacteriology* **19**: 391-512.
- Evangelista-Martínez Z & Moreno-Enríquez A (2007) Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos. *BioTecnología* **11**: 37-50.
- Fonseca Ardila YA, Castellanos Suárez DE & León Sicard TE (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* **62**: 6111-6119.
- Fornier D, Berrue F, Correa H, Duncan K & Kerr RG (2013) Chemical dereplication of marine actinomycetes by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry profiling and statistical analysis. *Analytica chimica acta* **805**: 70-79.
- Franco-Cirigliano MN, Rezende RdC, Gravina-Oliveira M, Pereira PHF, do Nascimento RP, Bon EPdS, Macrae A & Coelho RRR (2013) *Streptomyces misionensis* PESB-25 Produces a Thermoacidophilic Endoglucanase Using Sugarcane Bagasse and Corn Steep Liquor as the Sole Organic Substrates. *BioMed Research International* **2013**: 9.
- Gebreyohannes G, Moges F, Sahile S & Raja N (2013) Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine* **3**: 426-435.
- Gomes RC, Sêmedo LTAS, Soares RMA, Linhares LF, Ulhoa CJ, Alviano CS & Coelho RRR (2001) Purification of a thermostable endochitinase from *Streptomyces*

- RC1071 isolated from a cerrado soil and its antagonism against phytopathogenic fungi. *Journal of Applied Microbiology* **90**: 653-661.
- González O, Muñoz L & Valencia H (1992) Estudio preliminar de antibiosis in vitro por actinomicetes tipo Nocardioforms. *Revista Colombia de Ciencias Químico-Farmacéuticas* **20**: 29-33.
- Goodfellow M & Fiedler HP (2010) A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie Van Leeuwenhoek* **98**: 119-142.
- Goodfellow M, Kumar Y, Labeda D & Sembiring L (2007) The *Streptomyces violaceusniger* clade: a home for streptomycetes with rugose ornamented spores. *Antonie Van Leeuwenhoek* **92**: 173-199.
- Groth I, Schütze B, Boettcher T, Pullen CB, Rodriguez C, Leistner E & Goodfellow M (2003) *Kitasatospora putterlickiae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil, transfer of *Streptomyces kifunensis* to the genus *Kitasatospora* as *Kitasatospora kifunensis* comb. nov., and emended description of *Streptomyces aureofaciens* Duggar 1948. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **53**: 2033-2040.
- Guarro J, Antolín-Ayala MI, Gené J, Gutiérrez-Calzada J, Nieves-Díez C & Ortoneda M (1999) Fatal Case of *Trichoderma harzianum* Infection in a Renal Transplant Recipient. *Journal of Clinical Microbiology* **37**: 3751-3755.
- Gurung TD, Sherpa C, Agrawal PA & Lekhak B (2009) Isolation and Characterization of Antibacterial Actinomycetes from Soil Samples of Kalapatthar, Mount Everest Region. *Nepal Journal of Science and Technology* **10**: 173-182.
- Hamada M, Kinoshita N, Hattori S, Yoshida A, Okami Y, Higashide K, Sakata N & Hori M (1995) *Streptomyces kasugaensis* sp. nov.: A New Species of Genus *Streptomyces*. *Actinomycetologica* **9**: 27-36.
- Hamedi J, Mohammadipanah F, Potter G, Sproer C, Schumann P, Goker M & Klenk HP (2011) *Nocardiopsis arvandica* sp. nov., isolated from sandy soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **61**: 1189-1194.
- Hemashenpagam N (2011) PURIFICATION OF SECONDARY METABOLITES FROM SOIL ACTINOMYCETES. *International Journal of Microbiology Research*.
- Hernández A (2002) Evaluación de la actividad antagónica in vitro de Actinomycetes aislados a partir de rizósfera en cultivos de vid *vitis vinifera*, variedad riesling, contra *Botrytis cinerea* *Revista de Protección Vegetal* **17**: 2120-2124.
- Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, Kieser T, Bruton CJ, Kieser HM, Lydiate DJ, Smith CP, Ward JM & Schrempf H (1985) *Genetic Manipulation of Streptomyces; A Laboratory Manual*.
- Hotta K & Okami Y (1996) Diversity in aminoglycoside antibiotic resistance of actinomycetes and its exploitation in the search for novel antibiotics. *Journal of Industrial Microbiology* **17**: 352-358.
- Ikeno S, Aoki D, Sato K, Hamada M, Hori M & Tsuchiya KS (2002) *kasT* gene of *Streptomyces kasugaensis* M338-M1 encodes a DNA-binding protein which binds to intergenic region of *kasU-kasJ* in the kasugamycin biosynthesis gene cluster. *Journal of Antibiotics (Tokyo)* **55**: 1053-1062.
- Ilić S, Konstantinović S, Veljković V, Savić D & Gojgić-Cvijović G (2010) The impact of different carbon and nitrogen sources on antibiotic production by *Streptomyces hygrosopicus* CH-7. *Current research, Technology and Education topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* **2**: 1337-1342.
- Intra B, Matsumoto A, Inahashi Y, Omura S, Panbangred W & Takahashi Y (2014) *Streptosporangium jomthongense* sp. nov., an actinomycete isolated from rhizospheric soil and emendation of the genus *Streptosporangium*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **64**: 2400-2406.

- Jensen PR, Dwight R & Fenical W (1991) Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Applied and environmental microbiology* **57**: 1102-1108.
- Jiang C & Xu L (1996) Diversity of Aquatic Actinomycetes in Lakes of the Middle Plateau, Yunnan, China. *Applied and environmental microbiology* **62**: 249-253.
- Jiao W ZF, Zhao X, Hu J, Suh J-W (2013) A Novel Alkaloid from Marine-Derived Actinomycete *Streptomyces xinghaiensis* with Broad-Spectrum Antibacterial and Cytotoxic Activities. *PLoS ONE* **8**: 1-7.
- Kamble AP & Kulkarni SW (2012) Antibiotics Susceptibility Pattern of Actinomycetes Isolated from Soil under Cultivation of *Curcuma longa* L. *Universal Journal of Environmental Research and Technology* **2**: 625-629.
- Kampfer P (2006) The family Streptomycetaceae, Part I: Taxonomy. *The Prokaryotes*, Vol. 3 p.pp. 538-604. Springer New York.
- Kanini GS, Katsifas EA, Savvides AL, Hatzinikolaou DG & Karagouni AD (2013) Greek indigenous streptomycetes as biocontrol agents against the soil-borne fungal plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Journal of Applied Microbiology* **114**: 1468-1479.
- Kathiresan K, Balagurunathan R & Selvam MM (2005) Fungicidal activity of marine actinomycetes against phytopathogenic fungi. *Indian Journal of Biotechnology* **4**: 271-276.
- Kekuda TRP, Shobha KS & Onkarappa R (2010) Fascinating diversity and Potent biological activities of Actinomycete metabolites. *Journal of PHarmacy Research* **3**: 250-256.
- Kumar PS, Duraipandiyan V & Ignacimuthu S (2014) Isolation, screening and partial purification of antimicrobial antibiotics from soil *Streptomyces* sp. SCA 7. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences* **30**: 435-446.
- Kumar V, Bisht GS & Gusain O (2013) Terrestrial actinomycetes from diverse locations of Uttarakhand, India: Isolation and screening for their antibacterial activity. *Iranian Journal of Microbiology* **5**: 299-308.
- Leal AL, Álvarez CA, Cortes JA & Ovalle MV (2014) Análisis de la vigilancia de la resistencia bacteriana año 2013. Componente pediátrico y adulto. p.pp. GREBO, http://www.grebo.org/documentos/Boletin_Grebo_2014.pdf.
- Lee YH & Helmann JD (2013) Reducing the Level of Undecaprenyl Pyrophosphate Synthase Has Complex Effects on Susceptibility to Cell Wall Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **57**: 4267-4275.
- Leiva Franco P (1998) El medio ambiente en Colombia. p.pp. Instituto de hidrología, meteorología y estudios ambientales, <https://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/Bvirtual/000001/cap7.pdf>.
- Leiva P S, Yáñez S M, Zaror C L, Rodríguez S H & García-Quintana H (2004) Actividad antimicrobiana de actinomycetes aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. *Revista médica de Chile* **132**: 151-159.
- León J, Liza L, Soto I, D' Lourdes C, Patiño L & Zerpa R (2007) Actinomycetes bioactivos de sedimento marino de la costa central del Perú. *Revista Peruana de Biología* **14**: 259-270.
- Ludwig W, Strunk O, Westram R, et al. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* **32**: 1363-1371.
- Macrae A, Coelho RR, Peixoto R & Rosado A (2013) Tropical Soil Microbial Communities. *The Prokaryotes*, (Rosenberg E, DeLong E, Lory S, Stackebrandt E & Thompson F, eds.), p.pp. 85-95. Springer Berlin Heidelberg.
- Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA & Clark DP (2012) Commercial Products and Biotechnology. *Brock Biology of Microorganisms*, (Cummings B, ed.) p.pp. 415-416.
- Makkar NS, Nickson TE, Tran M, Biest N, Miller-Wideman M, Lawson J, McGary CI & Stonard R (1995) Phenamide, a fungicidal metabolite from *Streptomyces*

- albospinus A19301. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties. *Journal of Antibiotics (Tokyo)* **48**: 369-374.
- Manivasagan P, Kang K-H, Sivakumar K, Li-Chan ECY, Oh H-M & Kim S-K (2014) Marine actinobacteria: An important source of bioactive natural products. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **38**: 172-188.
- Marín García P (2010) Análisis de factores ecofisiológicos que influyen en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de toxinas en especies de "Fusarium". Thesis, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Márquez M, Martínez M & Franco-Correa M (2002) Aislamiento de Trichoderma sp. y actinomicetes a partir de suelos de clavel (*Dianthus caryophyllus*) y evaluación de su capacidad antagónica in vitro sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi*. *Agronomía Colombiana* **19**: 81-87.
- Medina C, García I, Caro M & Aristizábal FA (2007) Análisis AFLP de variación somaclonal en embriones somáticos de *Hevea brasiliensis*. *Revista Colombia de Ciencias Químico-Farmacéuticas* **36**: 70-80.
- Mendoza E, Estrada G, Monclou E, Garcia G, Ramirez LK, Acosta S, Guasca JJ & Penagos M (1999) Hidrografía. Vol. 1 p.p. 38-44. Universidad Nacional de Colombia Bogotá D.C.
- Moncheva P, Tishkow S, Dimitrova N, Chipeva V, Antonova-Nikolova S & Bogatzevska N (2002) Characteristics of soil Actinomycetes from Antarctica. *Journal of culture collections* **3**: 3-14.
- Muthu MR, Subbaiya R, Balasubramanian M, Ponmurugan P & Selvam M (2013) Isolation and Identification of Actinomycetes *Isophtericola variabilis* From Cauvery River Soil Sample. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **2**: 236-245.
- Nanjwade BK, Chandrashekhara S, Shamarez AM, Goudanavar PS & Manvi FV (2010) Isolation and morphological characterization of antibiotic producing actinomycetes. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* **9**: 231-236.
- Newman DJ & Cragg GM (2007) Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of Natural Products* **70**: 461-477.
- Nikaido H & Vaara M (1985) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological reviews* **49**: 1-32.
- Ningthoujam DS, Sanasam S & Nimaichand S (2009) A *Streptomyces sindenensis* Strain LS1-128 Exhibiting Broad Spectrum Antimicrobial Activity. *Research Journal of Biological Sciences* **4**: 1085-1091.
- Ningthoujam DS, Sanasam S & Nimaichand S (2011) Studies on Bioactive Actinomycetes in a Niche Biotope, Nambul River in Manipul, India. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*.
- Omran R & Kadhém MF (2012) Isolation and Identification of antibiotic-producing actinomycetes. *Journal of Babylon University/Pure and Applied Sciences* **22**: 285-292.
- Orjuela P, Sandon A, Franco M & Martinez M (2003) Evaluación de cepas antagónicas de actinomicetos y de *Trichoderma* spp. aislados a partir de suelos de cultivos de arroz (*Oryza sativa*) para el control de *Rhizoctonia solani*. *Revista Mundo Microbiológico* **2**: 9-14.
- Oskay M, Tamer AU & Azeri C (2004) Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African Journal of Biotechnology* **3**: 441-446.
- Otero V (2011) Aislamiento, Selección e Identificación de Actinomicetos, Bacterias Fotosintéticas No Sulfurosas y Bacterias Ácido Lácticas con Potencial Biofertilizante, a Partir de Suelos Asociados al Cultivo de Plátano en la Costa

- Atlántica Colombiana. Thesis, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Pacheco da Rosa J, Korenblum E, Franco-Cirigliano MN, *et al.* (2013) Streptomyces lunalinharesii Strain 235 Shows the Potential to Inhibit Bacteria Involved in Biorrosion Processes. *BioMed Research International* **2013**: 1-10.
- Pandey A, Shukla A & Majumdar SK (2005) Utilization of carbon and nitrogen sources by Streptomyces kanamyceticus M27 for the production of an Antibacterial antibiotic. *African Journal of Biotechnology* **4**: 909-910.
- Pandey A, Ali I, Butola KS, Chatterji T & Singh V (2011) Isolation and characterization of Actinomycetes from soil and evaluation of antibacterial activities of Actinomycetes against pathogens. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* **2**: 385-392.
- Paredes Y, Garces PA & Villa LM (2010) Informe de seguimiento de caracterización de 16 ríos navegables y la actividad portuaria. p.pp. Superintendencia de puertos y transporte: garantes del transporte, para el progreso del país, http://www.supertransporte.gov.co:8080/super/phocadownload/Nuestra_Institucion/Delegada_de_Puertos/INFORME_CHARACTERIZACION_DE_LOS_RIOS.pdf.
- Parés R & Juárez A (1997) Metabolismo secundario. *Bioquímica de los microorganismos*, (Reverté SA, ed.) p.pp. 322-344. Barcelona, España.
- Peña CP & Cardona G (2010) Dinámica de los suelos Amazónicos: procesos de degradación y alternativas para su recuperación. p.pp. 4-122. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi Colombia.
- Peña K & Castaño LM (2013) Evaluación “in - vitro” del potencial biológico de los actinomicetos aislados del suelo del jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira frente al control del fitopatógeno en banano Ralstonia solanacearum. Thesis, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia.
- Perez F, Endimiani A, Ray AJ, *et al.* (2010) Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii and Klebsiella pneumoniae across a hospital system: impact of post-acute care facilities on dissemination. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **65**: 1807-1818.
- Pickup KM, Nolan RD & Bushell ME (1993) A method for increasing the success rate of duplicating antibiotic activity in agar and liquid cultures of Streptomyces isolates in new antibiotic screens. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **76**: 89-93.
- Pinzón Gutiérrez YA, Bustamante SL & Buitrago Hurtado G (2013) Diagnóstico molecular diferencial Colletotrichum gloeosporioides y Fusarium oxysporum en ñame (Dioscorea sp.). *Revista Colombiana de Biotecnología* **15**: 52-60.
- Pisano M, Sommer M & Brett B (1987) Hudson River sediments as a source of actinomycetes exhibiting antifungal activity. *Applied Microbiology and Biotechnology* **27**: 214-217.
- Pisano M, Sommer M & Brancaccio L (1989) Isolation of bioactive actinomycetes from marine sediments using rifampicin. *Applied Microbiology and Biotechnology* **31**: 609-612.
- Prabhakar KA, Karad DD & Kulkarni SW (2015) Pesticide resistant and antimicrobial activity of some Streptomyces isolated from soil under cultivation of Curcuma longa L. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **4**: 579-588.
- Prosser BT & Palleroni NJ (1978) Nutritional Characterization of Some Selected Actinomycetes. *International Journal of Systematic Bacteriology* **28**: 516-522.
- Pruesse E, Peplies J & Glöckner FO (2012) SINA: Accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics* **28**: 1823-1829.
- Qin S, Li J, Chen HH, Zhao GZ, Zhu WY, Jiang CL, Xu LH & Li WJ (2009) Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of

- tropical rain forests in Xishuangbanna, China. *Applied and environmental microbiology* **75**: 6176-6186.
- Quast C, Priesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J & Glockner FO (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* **41**: D590-596.
- Rajan PC, Priya AM, Jayapradha D & Devi SS (2012) Isolation and Characterization of Marine Actinomycetes from West Coast of India for Its Antioxidant Activity and Cytotoxicity. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives* **3**: 641-645.
- Ramani DG & Kumar TV (2012) Antibacterial activity of Streptomyces SP SH7 isolated from cardamom fields of western ghats in south india. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* **3**: 957-968.
- Ramiírez Millán MC (2010) Comparación de la abundancia y diversidad de actinomicetos en sistemas agroforestales con Arazá y Cocona bajo dos condiciones ecosistémicas en el departamento del Guaviare. Thesis, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C.
- Rana S & Salam MD (2014) Antimicrobial Potential of Actinomycetes Isolated from Soil Samples of Punjab, India. *Journal of Microbiology & Experimentation* **1**: 1-6.
- Rifaat HM (2003) The biodiversity of Actinomycetes in the River Nile exhibiting antifungal activity. *Journal of Mediterranean Ecology* **4**: 5-7.
- Rodríguez-López ÉS, Cárdenas-Soriano E, Hernández-Delgado S, Gutiérrez-Diez A & Mayek-Pérez N (2013) Análisis de la infección de Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz. & Sacc. de frutos de aguacatero. *Revista Brasileira de Fruticultura* **35**: 898-905.
- Romero-Arenas O, Huerta Lara M, Huato MAD, Domínguez Hernández F & Arellano Victoria DA (2009) Características de Trichoderma harzianum, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Revista Colombiana de Biotecnología* **11**: 143-151.
- Sadeghy B & Hatami N (2013) Screening biological activities of soil-borne Streptomyces sp. against several phytopathogenic fungi. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection* **47**: 954-958.
- Sanasam S & Ningthoujam DS (2010) Screening of local actinomycete isolated in manipur for anticandidal activity. *Asian Journal of Biotechnology* **2**: 139-145.
- Sanchez S, Chavez A, Forero A, et al. (2010) Carbon source regulation of antibiotic production. *The Journal of Antibiotics* **63**: 442-459.
- Sarker SD, Latif Z & Gray AI (2005) Natural Products Isolation. p.pp. 328. Humana Press.
- Seyedsayamdost MR, Traxler MF, Clardy J & Kolter R (2012) Chapter Five - Old Meets New: Using Interspecies Interactions to Detect Secondary Metabolite Production in Actinomycetes. *Methods in Enzymology* **517**: 89-109.
- Sharma A (2010) Antibacterial effects of metabolites produced by actinomycetes collected from soil samples from bank of Indian rivers. Thesis, Bharathy college of Pharmacy, Bharathy Nagara, India.
- Sharma D, Kaur T, Chadha BS & Manhas RK (2011) Antimicrobial Activity of Actinomycetes Against Multidrug Resistant Staphylococcus aureus, E. coli and Various Other Pathogens. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* **10**: 801-808.
- Sharma H & Parihar L (2010) Antifungal activity of extracts obtained from actinomycetes. *Journal of Yeast and Fungal Research* **1**: 197-200.
- Sharma M (2014) Actinomycetes: source, identification and their applications. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **3**: 801-832.

- Shepherd MD, Kharel MK, Bosserman MA & Rohr J (2010) Laboratory Maintenance of *Streptomyces* species. *Current protocols in microbiology* **CHAPTER**: Unit-10E.11.
- Shirling EB & Gottlieb D (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* **16**: 313-340.
- SIAT-AC (2005) Sistema de Información Ambiental Territorial de la Amazonia Colombiana. p.pp. <http://siatac.co/web/guest/clima>, Colombia.
- Silambarasan S, Praveen Kumar E, Murugan T, Saravanan D & Balagurunathan R (2012) Antibacterial and antifungal activities of Actinobacteria isolated from Rathnagiri hills. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **2**: 99-103.
- Solano G, Rojas-Jimenez K, Jaspars M & Tamayo-Castillo G (2009) Study of the diversity of culturable actinomycetes in the North Pacific and Caribbean coasts of Costa Rica. *Antonie Van Leeuwenhoek* **96**: 71-78.
- Solecka J, Zajko J, Postek M & Rajnisz A (2012) Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. *Central European Journal of Biology* **7**: 373-390.
- Straight PD, Willey JM & Kolter R (2006) Interactions between *Streptomyces coelicolor* and *Bacillus subtilis*: Role of Surfactants in Raising Aerial Structures. *Journal of Bacteriology* **188**: 4918-4925.
- Strzelczyk E, Rouatt JW & Peterson EA (1969) Studies on Actinomycetes from Soils of Baffin Island. *ARCTIC* **22**: 85-168.
- Sudha S & Masilamani SM (2012) Characterization of cytotoxic compound from marine sediment derived actinomycete *Streptomyces avidinii* strain SU4. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine* **2**: 770-773.
- Terkina IA, Parfenova VV & Ahn TS (2006) Antagonistic activity of actinomycetes of Lake Baikal. *Applied Biochemistry and Microbiology* **42**: 173-176.
- Vijayakumar R, Panneerselvam K, Muthukumar C, Thajuddin N, Panneerselvam A & Saravanamuthu R (2012) Optimization of Antimicrobial Production by a Marine Actinomycete *Streptomyces afghaniensis* VPTS3-1 Isolated from Palk Strait, East Coast of India. *Indian Journal of Microbiology* **52**: 230-239.
- Vinchira DM (2014) Evaluación de tres aislamientos bacterianos como potenciales promotores de crecimiento vegetal en plantas de arroz (*Oryza sativa*). Thesis, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Wang F, Xu XX, Qu Z, Wang C, Lin HP, Xie QY, Ruan JS, Sun M & Hong K (2011) *Nonomurea wenchangensis* sp. nov., isolated from mangrove rhizosphere soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **61**: 1304-1308.
- Whitman W, Goodfellow M, Kampfer P, Busse H-L, Trujillo ME, Ludwig W & Suzuki K-i (2012) The Actinobacteria part A and B. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 5 p.pp. 33-1996. Springer New York
- WHO (2001) WHO Global strategy for containment of antimicrobial resistance. p.pp. http://www.who.int/drugresistance/WHO_Global_Strategy_English.pdf.
- Williams ST, Shameemullah M, Watson ET & Mayfield CI (1972) Studies on the ecology of actinomycetes in soil—VI. The influence of moisture tension on growth and survival. *Soil Biology and Biochemistry* **4**: 215-225.
- Wink J (2009) Compendium of Actinobacteria. p.pp. 1-37. University of Braunschweig, Alemania.
- Wiwin R (2010) Identification of *Streptomyces* sp-MWS1 producing antibacterial compounds. *Indonesian Journal of Tropical and Infectious Disease* **1**: 80-85.
- Yarza P, Richter M, Peplies J, Euzéby J, Amann R, Schleifer K-H, Ludwig W, Glöckner FO & Rosselló-Móra R (2008) The All-Species Living Tree project: A 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Systematic and Applied Microbiology* **31**: 241-250.

- Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glockner FO, Ludwig W, Schleifer K-H, Whitman WB, Euzéby J, Amann R & Rossello-Mora R (2014) Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology* **12**: 635-645.
- Yomayusa N, Suárez IC, Castañeda E, Hernández P, Gaitán H, Altahona H, Ibáñez M, Hidalgo M, Moreno JE & Torrado E (2008) Caracterización de un brote de infección por *Acinetobacter baumannii* en una unidad de cuidado crítico en Bogotá, Colombia. *Infectio* **12**: 11-20.
- Yu L, Dai HF, Zhao YX, Zeng YB, Jiang WT, Mei WL & Zeng HC (2011) Three new compounds from soil actinomycete *Streptomyces albospinus* 15-4-2. *Journal of Asian natural products research* **13**: 901-906.
- Yu L, Dai H-f, Zhao Y-x, Zuo W-j, Dong W-h, Mei W-l & Zeng H-c (2013) Two new sesquiterpene derivatives from soil actinomycete *Streptomyces albospinus* 15-4-2. *Phytochemistry Letters* **6**: 110-112.
- Zhu H, He CC & Chu QH (2011) Inhibition of quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* by pigments extracted from *Auricularia auricular*. *Letters in applied microbiology* **52**: 269-274.
- Zhu H, Swierstra J, Wu C, Girard G, Choi YH, van Wamel W, Sandiford SK & van Wezel GP (2014) Eliciting antibiotics active against the ESKAPE pathogens in a collection of actinomycetes isolated from mountain soils. *Microbiology* **160**: 1714-1725.