

**Universidad Nacional
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Escuela de Ciencias Biológicas
Licenciatura en Biotecnología**

Informe escrito final

**Evaluación de la capacidad de inhibición de aislamientos de *Streptomyces*
spp. obtenidos de muestras de suelo que bordean el Río Pirro en el
Campus Omar Dengo, Universidad Nacional, Costa Rica**

Sara Felicia Segura Zacharkiewicz

**“Tesis” presentado como requisito parcial para optar por el grado de
Licenciatura en Biotecnología**

Campus Omar Dengo

Heredia, 2020

Este trabajo de graduación fue _____ por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biotecnología.

M.Sc Carola Scholz

Representante del Decano de Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

M.Sc Luis Vega Corrales

Representante del Director de la Escuela de Ciencias Biológicas

MPM. Jorengeth Abad Rodríguez Rodríguez

Tutor

Lic. Esteve Mesen Porras

Asesor

PhD. Gerardo Rodríguez Rodríguez

Asesor

Licda. Carolina Marín Vindas

Invitada especial

Agradecimiento

Agradezco a los docentes de la carrera de Biología, principalmente del énfasis de Biotecnología, de la facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Costa Rica, en especial a mi tutor, MPM. Jorengeth Abad Rodríguez Rodríguez por dedicarse a esta investigación y formar parte de otro objetivo alcanzado. También agradezco a mis asesores Lic. Esteve Mesen Porras y PhD. Gerardo Rodríguez Rodríguez por apoyarme en cada paso.

Dedicatoria

Dedico este trabajo con mucho cariño a mi mamá cuyo apoyo me permitió lograr concluir mis estudios. También quiero dedicarlo a todos los estudiantes de la carrera de Biología con énfasis en Biotecnología como motivación para que cumplan todas sus metas.

Índice

Miembros del tribunal	I
Agradecimientos.....	II
Dedicatoria.....	III
Índice.....	V
Índice de figuras.....	VII
Índice de imágenes.....	VIII
Abreviaturas.....	IX
Resumen	X
1. Introducción	11
1.1 Antecedentes	11
1.2 Justificación	15
1.3 Planteamiento del problema.....	16
1.4 Objetivos.....	17
1.4.1 Objetivo General.....	17
1.4.2 Objetivos Específicos	17
2. Marco teórico	17
2.1 Antibióticos	17
2.2 Resistencia antibiótica	19
2.3 <i>Streptomyces</i> spp.....	22
3. Marco Metodológico	22
3.1 Sitio de recolección y obtención de las muestras	22
3.2 Procesamiento de las muestras y aislamiento	23
3.3 Prueba de sensibilidad	24
3.4 Fermentación sólida y purificación de extracto	25
3.5 Fermentación líquida y purificación de extracto	26
3.6 Método de difusión por tapón de agar	26
3.7 Método de difusión en agar por pozos	28
3.8 Análisis estadístico	29
4. Resultados	31

4.1	Procesamiento de las muestras y aislamiento	31
4.2	Prueba de sensibilidad	32
4.3	Método de difusión por tapón de agar	35
4.4	Método de difusión en agar por pozos	39
5.	Discusión.....	41
6.	Conclusiones	43
7.	Recomendaciones.....	44
8.	Referencias	45

Índice de figuras

Figura 1.....	25
Figura 2.....	28
Figura 3.....	29
Figura 4.....	33
Figura 5.....	34
Figura 6.....	36
Figura 7.....	37
Figura 8.....	39
Figura 9.....	40

Índice de imágenes

Imagen 1.....	31
Imagen 2.....	32
Imagen 3.....	35
Imagen 4.....	39

Abreviaturas o acrónimos

ATCC	“American Type culture Collection”
BLEE	Beta-lactamasas de espectro extendido
DMSO	Dimetilsulfóxido
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
VRE	Bacterias resistentes a vancomicina
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Enterobacter</i> sp.
MA	Agar MacConkey
MH	Agar Müller-Hinton
Pen- Strep	Penicilina-Estreptomicina
PDA	Agar Papa Dextrosa
TSA	Agar Soja Tríptico

Resumen

Los actinomicetos son bacterias filamentosas de las cuales provienen la mayoría de los antibióticos utilizados en la medicina actual. Se obtuvieron muestras de suelo de los alrededores del río Pirro en el campus Omar Dengo de la Universidad Nacional, Costa Rica para lograr aislamientos de *Streptomyces* spp. e investigar las propiedades antimicrobianas de sus metabolitos contra cuatro cepas patógenas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella* sp. silvestre extraído de un aislamiento clínico y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Los 19 aislamientos de *Streptomyces* spp. obtenidos del campo fueron sometidos a una prueba de sensibilidad para elegir los más promisorios y luego fueron fermentados en medio sólido y líquido. Se hicieron extracciones con solventes polares y se hicieron pruebas de difusión en agar por pozos y difusión por tapón de agar para identificar los halos de inhibición de mayor diámetro. El análisis estadístico mostró que la mayoría de los aislamientos presentaron actividad inhibitoria contra la Gram positiva *Staphylococcus aureus*, sin embargo, dos aislamientos lograron inhibir también a *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. En cuanto a la extracción de metabolitos, el solvente acetonitrilo en relación con DMSO y metanol, fue el mejor solvente en cual se obtuvieron halos de inhibición, pero se recomienda probar otros caldos de fermentación y solventes puros o en mezcla. Se concluye que el río Pirro es una fuente de microorganismos con potencial inhibitorio y los aislamientos evaluados tienen un potencial biotecnológico al evidenciar que producen metabolitos con importancia biomédica.

1. Introducción

Los metabolitos secundarios producidos por los microorganismos son explotados de diferentes maneras por los seres humanos. Entre estas sustancias se encuentran los antibióticos utilizados en la medicina para tratar enfermedades infecciosas. La búsqueda de nuevas sustancias microbianas ha tomado fuerza ya que una problemática global corresponde al descubrimiento de bacterias con resistencia hacia los compuestos antimicrobianos.

1.1 Antecedentes

Los actinomicetos son bacterias filamentosas que han sido ampliamente estudiados por más de cincuenta años debido a su prominente producción de compuestos activos (Possiede et al., 2017). A partir del aislamiento de estos microorganismos se han descubierto más de 10000 metabolitos secundarios producidos por los mismos, aunque la mayor parte provienen del género *Streptomyces* (Possiede et al., 2017).

Trabajos de investigación como los desarrollados por Atta, El-Sayed, El-Desoukey, Hassan, & El-Gazar (2012) se enfocaron en la extracción de natamicina de una cepa del género *Streptomyces* que posterior a la realización de estudios morfológicos, bioquímicos y genéticos resultó ser *Streptomyces lydicus*. La actividad de dicha cepa se evaluó mediante el método de difusión en agar por pozos contra bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, hongos unicelulares y filamentosos. Los microorganismos contra los cuales la extracción presentó actividad fueron *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus lutea*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata*, *Botrytis fabae* y *Penicillium chrysogenum*. La extracción se llevó a cabo con cloroformo, pero una vez que se evaporó la fase orgánica el material residual se disolvió en DMSO para una separación de componentes utilizado cromatografía en capa fina. Además, se resolvió que el metabolito es polar puesto que se disuelve fácilmente en cloroformo, *n*-butanol, acetona, etanol, metano e isopropilo al 10% pero insoluble en agua, éter de petróleo, hexano y benceno. La identificación del antibiótico sugiere que es de la familia de los poliénicos.

En un estudio hecho en el año 2010, en Wisconsin (EE. UU) se hizo un análisis de la carga de actinomicetos en *Vaccinium macrocarpon*, una variedad de arándano que se encuentra en latitudes norte de suelos ácidos y posee un bajo contenido de nitrógeno. El aislamiento se hizo en medios de agar selectivo y mediante estudios de secuenciación, utilizando el gen ribosomal ARN-16S, se detectó que la mayoría de los actinomicetos pertenecían al género *Streptomyces*. De las 110 cepas aisladas, se encontraron dos con efectos antagonistas contra *Colletotrichum acutatum* (Ascomycota, Glomerellale) aislada de arándanos con infecciones y *Trichoderma* sp (Ascomycota, Hypocreales) obtenida de la raíz de los arbustos y el cual es patógeno para varios árboles frutales (Mason, Zeldin, Currie, Raffa, & Mccown, 2014). El estudio de antagonismo se llevó a cabo, al someter a los hongos a crecer en una placa con un inóculo de *Streptomyces* sp. De esta manera, se tomó una placa Petri con agar papa-dextrosa (PDA) y se inóculo la bacteria de forma puntual en el centro. Luego se tomó el hongo y se inoculó en forma circular a una distancia de 2.5 cm de la bacteria ya que es un método sencillo y comúnmente utilizado para la medición de actividad inhibitoria. La inhibición se calculó mediante la proporción de crecimiento del hongo en cocultivo con la bacteria respecto del control negativo (se reemplaza la bacteria con agua destilada para medir el crecimiento del hongo)(Mason et al., 2014).

En otras investigaciones se ha estudiado la actividad antibiótica de *Streptomyces* spp. con un enfoque botánico, evaluado contra diferentes microorganismos como *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* (Proteobacteria, Xanthomonadales) en países asiáticos, el cual es el agente causante de infecciones en los cultivos de arroz. Los resultados fueron positivos ya que las cepas del género *Streptomyces* estudiadas inhibieron *Xanthomonas* hasta en un 98% generando el primer resultado reportado de un compuesto bioactivo eficiente contra un microorganismo patógeno que se pudiera comercializar eventualmente en el mercado de los antibióticos (S. B. Park, Lee, Suh, Kim, & Lee, 2011).

Por otra parte, se valoró la actividad antimicótica contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Ascomycota, Hypocreales) el cual afecta el cultivo de palmas. Fguira, Fotso, Ben Ameer-Mehdi, Mellouli, & Laatsch (2005) aislaron una nueva cepa nueva nombrada como US80 la cual alcanzó una actividad contra microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos, así como también contra hongos. Los microorganismos que fueron probados en

cultivo dual contra esta cepa en particular incluyeron *M. luteus* LB 14110, *E. coli* ATCC 8739, *V. dahliae* y *Fusarium* sp. Una de las ventajas encontradas para esta bacteria es que puede crecer fácilmente controlando algunas condiciones fisicoquímicas, ya que requiere de temperaturas que oscilan entre los 25-37°C con un óptimo de 30°C y pH 7 en condiciones aerobias.

Fusarium oxysporum (Ascomycota, Hypocreales), *F. culmorum* (Ascomycota, Hypocreales), y *Rhizoctonia solani* (Basidiomycota, Cantharellales) son hongos que ocasionan enfermedades en las plántulas de pino. Dahm & Golinska (2013) estudiaron la capacidad antagonista de *Streptomyces* spp., particularmente en muestras de suelo, mediante técnicas *in vitro* e *in vivo*. Los estudios de antagonismos se llevaron a cabo mediante la cuantificación de los radios de crecimiento del hongo antagonista en relación con el control negativo axénico. En dicho trabajo se detectó que *F. oxysporum* y *F. culmorum* mostraron sensibilidad ante exopolisacáridos extraídos del sobrenadante del cultivo líquido de tres muestras de *Streptomyces cyaneus*, pero *R. solani* resultó ser más resistente.

Por su parte, Das, Ward, & Burke (2010) desarrollaron un enfoque diferente y se concentraron en los efectos de la actividad antimicrobiana de los actinomicetos. Probaron tres cepas de *Streptomyces* sp., para valorar su uso como probiótico en la acuicultura. Las cepas colonizaron larvas y adultos de *Artemias* (Arthropoda, Anostraca), para luego liberar *Vibrio harveyi* y *V. proteolyticus* al medio. La supervivencia mejoro contra ambos patógenos, pero fue mejor contra *V. harveyi* tanto en larvas como adultos (60-67%), respecto a *V. proteolyticus* (52-61%) ya que el segundo es más patogénico.

Por otro lado, la investigación de Ubillus, Quispe, Durán, Trujillo, & Salazar, (2015) sobre los metabolitos secundarios de *Streptomyces erythrogriseus* cepa M10-77 aislada de sedimento marino recogido en Perú, presentó un enfoque clínico debido a que se evaluó la actividad antagonista frente a patógenos de importancia médica como los resistentes a multi-drogas; los patógenos utilizados fueron extraídos de un centro médico en Lima, Perú; ensayando bacterias Gram-positivas como *S. aureus* 1.094, *S. epidermidis* 1.093, *Staphylococcus coagulasa* negativo 348 y *Enterococcus* spp. 239 y Gram-negativas como *P. aeruginosa* 303, *E. coli* 150, *Enterobacter aerogenes* 171 y *Acinetobacter* spp. 134. Los ensayos fueron realizados por medio del método de doble capa en la cual la primera capa

contenía *S. erythrogriseus* crecido en agar MacConkey (MA) y sobre ella se vertió agar Soja-Tríptico (TSA) que contenía un cultivo del patógeno por analizar. Las placas fueron incubadas por 24h a 37°C y las lecturas fueron midiendo el tamaño de los halos de inhibición en milímetros. Los resultados mostraron una alta actividad contra las bacterias Gram-positivas con halos superiores a 70mm de diámetro y actividad mediana contra bacterias Gram-negativas con halos inferiores a 20 mm de diámetro.

En relación con el enfoque de Ubillus, Quispe, Durán, Trujillo, & Salazar, (2015) Nishat & Alam (2017), realizaron ensayos de antagonismo de *Streptomyces* spp. aislados de suelo de Bangladesh, cuyas cepas obtenidas fueron enfrentadas contra *S. aureus*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli* y *P. aeruginosa*. Los autores utilizaron la técnica de rayado único el cual es un método alternativo para medir actividad inhibitoria, donde el inóculo de actinomiceto se hace en una línea que cruza la placa y los patógenos se rayan perpendicularmente. Con base en los resultados de los ensayos junto con otros análisis morfológicos y genéticos, lograron determinar que, de las 156 cepas aisladas, doce alcanzaron una buena actividad antimicrobiana.

En relación a lo anterior, Yu *et al.* (2008) trabajaron en la estandarización del cultivo de *Streptomyces rimosus* ya que se había reportado su alto rendimiento de producción de compuestos antifúngicos. Los investigadores se enfocaron en los requerimientos necesarios para cultivar la bacteria y llegaron a establecer el inóculo a partir de la definición de las propiedades bioquímicas del medio de cultivo como pH, fuente de nitrógeno y carbono; así como las condiciones físicas del medio, incluyendo temperatura y agitación. Por su parte, Sanches Henao, Gomez Grimaldos, & Quintero Diaz (2012) desarrollaron un enfoque similar, dado que estandarizaron un medio de cultivo para obtener la mejor producción de ácido clavulánico, el cual actúa como un potente beta-lactámico. Además, se le dio mucha importancia a la concentración de glicerol ya que el mismo influenciaba el cultivo en biorreactor.

Con el fin de discutir un enfoque biomédico, se menciona el estudio de Higginbotham & D. Murphy (2010) los cuales encontraron una cepa de *Streptomyces* sp. a la cual llamaron IMD 2703, aislada de suelo en Camboya, con actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Esta cepa presentó 80% de homología con

Streptomyces globosus DSM41122. Los ensayos antimicrobianos se llevaron a cabo mediante la técnica de difusión en agar por pozos y se purificó mediante precipitación, extracción con carbón activado e intercambio iónico y se observó que es soluble en agua y térmicamente estable en pH ácido.

Por último y similar al estudio de Higginbotham & D. Murphy (2010), la investigación de Jin et al (2007) también hizo aislamientos de suelo (Corea del Sur) pero detectó que su *Streptomyces* sp. cepa CS684 mostró actividad antibacterial contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y *Enterococcus* resistentes a vancomicina. Los ensayos antimicrobianos detectaron actividad contra Gram-positivas pero no contra Gram-negativas. Posteriormente se purificó el antibiótico mediante una combinación de centrifugación y evaporación rotatoria para finalmente disolver el material en metanol y purificar por filtración y cromatografía. Además, los patrones de comportamientos del extracto se asemejan a las de antibióticos poliéteres como monensina y narasina.

1.2 Justificación

La búsqueda de nuevos antibióticos surge como un esfuerzo global e interdisciplinario para atacar el presente descubrimiento de microorganismos con resistencia a antibióticos. Estadísticas de Estados Unidos indican que en el 2014, alrededor de 5% de las muertes fueron causadas por enfermedades crónicas respiratorias, principalmente provocadas por infecciones de microorganismos resistentes como *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp., conocidas como patógenos ESKAPE (Dodds, 2016; Dwyer-lindgren et al., 2017; MacGowan & Macnaughton, 2017).

La bioprospección para la búsqueda de nuevos antibióticos se ha expandido a diferentes tipos de sustratos como por ejemplo en los océanos, suelos, regiones de condiciones extremas, entre otros. *Streptomyces* spp. ha sido y es una de las mayores fuentes de producción de metabolitos secundarios, donde se incluyen aquellas moléculas con actividad antimicrobiana. Este género de microorganismos se conoce por su habilidad de producir una variedad de metabolitos secundarios: antibióticos, antifúngicos, antivirales,

antihipertensivos, antitumorales y inmunosupresores (de Lima Procópio, da Silva, Martins, de Azevedo, & de Araújo, 2012a).

Se han logrado identificar múltiples cepas de *Streptomyces* spp. que producen antibióticos aptos para uso humano. Sin embargo, y dada la problemática de resistencia, se necesitan encontrar un mayor número de sustancias con propiedades antimicrobianas para combatir las infecciones que amenazan la salud tanto humana como animal. La búsqueda y cultivo de nuevas especies de *Streptomyces* spp. en diferentes sustratos podría resultar en la identificación y producción de metabolitos secundarios innovadores, que permitan solucionar los problemas de importancia médica asociados con patógenos microbianos, particularmente en relación con el descubrimiento de aquellos multirresistentes a diversos grupos de antibióticos. Con este trabajo se pretende determinar si aislamientos de actinomicetos determinados mediante morfología y recuperados de muestras de suelo que provienen de los alrededores del río Pirro (Heredia, Costa Rica) presentan actividad antimicrobiana contra cuatro bacterias de interés médico que pertenecen al grupo ESKAPE y producen altos cuadros de patogenicidad a nivel clínico (Dodds, 2016; MacGowan & Macnaughton, 2017). Se ha determinado que el río Pirro tiene niveles severos de contaminación por un mal manejo de desechos sólidos y aguas fecales (Vargas, Castro, Chacón, Monge, & Obando, 2011) que potencialmente puede fungir como hábitat de bacterias con producción de metabolitos con actividad inhibitoria de patógenos (Narancic et al., 2012). Al mencionado grupo de bacterias podrían pertenecer posibles aislamientos de *Streptomyces* spp. aún no descritas que posean la capacidad de producir antibióticos novedosos y que presenten actividad contra cuatro bacterias de interés médico perteneciente al grupo ESKAPE y producen altos cuadros de patogenicidad a nivel clínico (Dodds, 2016; MacGowan & Macnaughton, 2017).

1.3 Planteamiento del problema

Debido a los problemas de resistencia a antibióticos que ocurren a nivel médico-veterinario y productivo debido a la aparición de nuevas cepas multirresistentes, se plantea la pregunta: ¿Existen cepas de *Streptomyces* spp. de las muestras de tierra tomadas en los alrededores del río Pirro, en la propiedad de la Universidad Nacional, campus Omar Dengo, que sean capaces de producir sustancias antimicrobianas eficaces contra *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*?

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Identificar la capacidad de inhibición de aislamientos de *Streptomyces* spp. obtenidos de muestras de suelo por medio de ensayos de antagonismo contra cuatro cepas de bacterias estandarizadas para su potencial uso en el área biomédica.

1.4.2 Objetivos Específicos

Obtener aislamientos de *Streptomyces* spp. de muestras de suelo recolectadas en los alrededores del río Pirro, mediante el uso de medios de cultivo selectivos.

Determinar la capacidad de antagonismo que presentan los aislamientos de *Streptomyces* spp. sobre el crecimiento de microorganismos patógenos como criterio para la selección de las cepas con actividad antimicrobiana.

Evaluar el potencial inhibitorio de aislamientos de *Streptomyces* spp. contra cuatro cepas patógenas mediante el uso de técnicas cuantitativas.

2. Marco teórico

2.1 Antibióticos

Los antibióticos son sustancias de origen natural que permiten deshacerse de bacterias sin afectar al huésped (Belloso, 2009). Se les nombró como tal para referirse a organismos con capacidad de producir sustancias con propiedades antimicrobianas (Belloso, 2009). Estos surgen en respuesta al descubrimiento de las enfermedades con causas de origen biológico, hoy conocidos como patógenos (Vergara Quintero, 2007) y su importancia radica en que el ser humano depende de ellos para eliminar infecciones microbianas ya que desde su descubrimiento en el siglo XX, las muertes por infecciones ocasionadas por microorganismos han disminuido (de Lima Procópio et al., 2012a).

Desde finales del siglo XIX, al enterarse que hay colorantes de anilina que se unen específicamente a bacterias, los científicos llegaron a la conclusión que pueden existir

sustancias con capacidad de atacar a los microorganismos sin causar daño al huésped (Belloso, 2009). Años después se encontró que el tinte rojo, sulfamidocrisoidina (cuyo sinónimo es sulfanilamida), era efectivo contra varias cepas de la bacteria *Streptococcus* sp. (Belloso, 2009). En dicha investigación, las patentes para el compuesto activo se adquirieron únicamente para el estudio, pero eventualmente se logró vender con el nombre comercial Prontosil®. Debido a su éxito como antibiótico, en 1937 se lanza al mercado el “Sulfanilamide Elixir” el cual contenía dietilenglicol, un líquido dulce pero venenoso, sin embargo, solo se requería evaluar la eficiencia del compuesto activo para que un medicamento llegara al mercado, por lo que murieron 100 personas antes de retirar el producto y así surgió la “U.S. Food and Drug Administration” (FDA) o “Administración de Drogas y Alimentos (ente regulador de drogas y alimentos en EE. UU) (Belloso, 2009).

Sin embargo, el descubrimiento más importante en el campo de los antibióticos fue una coincidencia. Alexander Flemming estaba estudiando las propiedades de *Staphylococcus aureus*. Debido a un mal manejo de placas, surgió contaminación de un hongo que inhibía a la bacteria y así descubrió que los metabolitos secundarios de *Penicillium notatum* presentaban actividad antimicrobiana, con lo cual surge el primer antibiótico llamado penicilina (Zaffiri, Gardner, & Toledo-Pereyra, 2012).

En cuanto al origen de los antibióticos, los naturales pueden ser peptídicos, policétídicos, o de cloranfenicol, entre otros (Běhal, 2002). Los peptídicos son activos principalmente contra las bacterias Gram positivas e inhiben la síntesis de la pared celular y su crecimiento (Běhal, 2002). También existen antibióticos que combaten las Gram negativas, sin embargo son menos efectivos ya que las moléculas deben viajar por la membrana externa mediante porinas hasta alcanzar las enzimas ensambladoras de peptidoglicano o proteínas de unión a penicilina (PBP por sus siglas en inglés) (Monge, 2013). Dentro de los grupos de antibióticos, los principales representantes son los beta-lactámicos, entre los cuales destacan las penicilinas, cefalosporinas y ácido clavidulánico con un anillo beta-lactámico aromático (Běhal, 2002). También se pueden encontrar los glicopéptidos como vancomicina (Běhal, 2002). Algunos antibióticos derivan de los policétidos como las tetraciclinas y son de amplio espectro, contra bacterias Gram positivas y negativas, así como inhibidores de proteosíntesis. También se puede encontrar el

cloranfenicol y la estreptomina, aunque el primero se usa casi exclusivamente como derivado sintético (Běhal, 2002).

Como se mencionó anteriormente, los antibióticos provienen de la naturaleza, sin embargo, pueden ser modificados para mejorar su acción y se clasifican como semisintéticos; siendo los más utilizados las penicilinas, las cefalosporinas, los quinolonas, los macrólidos y las tetraciclinas (Fischbach & Walsh, 2009). Para lograr dichas modificaciones, el núcleo se queda intacto y se modifican secciones adyacentes para mejorar su función (Fischbach & Walsh, 2009). Las nuevas generaciones de antibióticos se han modificado para aquellos microorganismos que se volvieron resistentes a las previas, sin embargo, la falta de nuevos antibióticos naturales ha aumentado el auge de moléculas completamente sintéticas como las oxazolidinonas, lipopéptidos y mutilinas con mayores efectos secundarios (Fischbach & Walsh, 2009).

Por otro lado, su modo de acción puede ser muy variado, pueden matar bacterias o prevenir/inactivar su crecimiento, lo cual se denomina como bactericida y bacteriostático respectivamente (Roose-Amsaleg & Laverman, 2016). Sin embargo se pueden mencionar tres tipos de actividades antimicrobianas principales que afectan el metabolismo bacteriano, las cuales actúan sobre la síntesis de pared celular, proteosíntesis o reparación y replicación del ADN (Roose-Amsaleg & Laverman, 2016). Con relación a lo anterior, se utiliza una nomenclatura específica para determinar el espectro de ataque de cada compuesto. Aquellos que tienen amplio espectro afectan a una extensa gama de patógenos y otros a solo un grupo específico los cuales se describen como antibióticos de espectro limitado (Roose-Amsaleg & Laverman, 2016).

2.2 Resistencia antibiótica

La resistencia a antibióticos se puede definir, desde el punto de vista microbiológico, como un mecanismo de resistencia determinado genéticamente (adquirido o intrínseco) que genera inmunidad ante compuestos antimicrobianos (Dodds, 2016). Esta situación se ha relacionado con el incremento de casos de hospitalización y muerte de pacientes infectados (Berendonk et al., 2015).

En su discurso para el premio Nobel en 1945, Flemming advirtió que puede llegar el momento en que alguien se auto recete mal y exponga a bacterias a dosis no letales, generando resistencia (Dodds, 2016). Como ejemplo se cita la primera comercialización de la meticilina en 1959, la cual inactiva las beta-lactamasas y en la siguiente década se encontraron en hospitales, aunque pocas, cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a ella (MRSA). Por otro lado, la vancomicina, la cual se lanzó al mercado en 1954, no tuvo problemas sino hasta 1980, cuando se detectó un crecimiento en la incidencia de bacterias resistentes a vancomicina (VRE) (Dodds, 2016).

La resistencia puede ser intrínseca o puede ser adquirida mediante mutaciones o transferencia horizontal de bacterias, fagos o ADN libre (Sharma, Johnson, Cizmas, McDonald, & Kim, 2016). Las acciones asociadas a los mecanismos de resistencia incluyen evitar que el antibiótico llegue a su estructura meta mediante bombas de eflujo o poros, destrucción del compuesto activo y reprogramando o camuflando la estructura diana (Roose-Amsaleg & Laverman, 2016).

La prevención de arribo del antibiótico a su objetivo, se da principalmente en las bacterias Gram-negativas, donde los antibióticos hidrofílicos deben ingresar a la célula mediante porinas no específicas en la membrana por lo que las bacterias desarrollan una mayor regulación sobre ellas, o las reemplazan por canales más específicos que no permiten su paso, lo cual resulta en una eficiencia limitada del compuesto antibiótico (Blair, Webber, Baylay, Ogbolu, & Piddock, 2015). En cuanto al bombeo del antibiótico al exterior, éste se lleva a cabo mediante las bombas de eflujo o multidrogas, los cuales se encargan de expulsar compuestos inespecíficos. Las mencionadas son sobre expresadas y muy eficientes ya que pueden expulsar varios antibióticos de diferentes estructuras (Malone & Gordon, 2016).

Por otro lado, pueden ocurrir mutaciones o modificaciones puntuales en ciertas regiones del ADN bacteriano, a las cuales el antibiótico se enlaza para generar su efecto. Si la bacteria modifica su estructura a través de procesos de metilación (más común), sin afectar su correcto funcionamiento, los antibióticos reducen su actividad y/o ya no se logran enlazar fuertemente a su estructura objetivo, perdiendo así su efecto (Blair *et al.*, 2015). Sin embargo, también se encuentra la modificación directa del antibiótico que puede ocurrir por hidrólisis

de la molécula activa o inactivación por transferencia de un grupo químico (Malone & Gordon, 2016)

Es importante mencionar que los mecanismos de resistencia se pueden categorizar según el compuesto antibiótico. Entre los más conocidos se encuentran las bacterias que producen beta-lactamasas, las cuales son enzimas que pueden hidrolizar estructuras de los antibióticos beta-lactámicos. Estas enzimas se encuentran con más frecuencia en *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*, entre otros (Fica, 2014). Este tipo de mecanismo se detectó por primera vez contra la amoxicilina, ampicilina y cefalosporinas de primera generación (Fica, 2014). De las beta-lactamasas derivan diferentes grupos de enzimas entre los cuales se encuentran las carbapenemasas. Los antibióticos carbapenémicos son estables ante las beta-lactamasas, ya que no logran hidrolizar su estructura, aunque son vulnerables ante las carbapenemasas (Fica, 2014). Por otro lado, las beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), pueden inhibir hasta cefalosporinas de segunda y tercera generación y se descubrieron por asociación a infecciones masivas de *E. coli* y *K. pneumoniae* resistentes (Bush & Jacoby, 2010).

Actualmente, menos antibióticos están siendo lanzados al mercado por las compañías farmacéuticas por que los ingresos respecto a estos medicamentos han ido disminuyendo (MacGowan & Macnaughton, 2017). La investigación en el campo de los antibióticos se ha vuelto cada vez más difícil por las nuevas regulaciones impuestas y nuevos métodos o pruebas para detección de sustancias antimicrobianas, ya que las técnicas genómicas no han sido tan eficaces como se esperaba (MacGowan & Macnaughton, 2017). Se ha detectado que los falsos positivos en lecturas individuales por errores de secuenciación o contaminación con otros organismos son recurrentes (Su, Satola, & Read, 2019). En consecuencia, se estima que, en Europa, 2500 personas mueren de esta causa, con un impacto de €1.5 billones al sistema de salud (MacGowan & Macnaughton, 2017). Debido a esto, se observa un alza en el uso de antibióticos antiguos que se había abandonado por sus consecuencias tóxicas como fosfomicina, temocilina, pristinamicina y colistina (MacGowan & Macnaughton, 2017). Sin embargo, la detección de genes vitales para la supervivencia de las bacterias está abriendo un campo de estudio dedicado al uso de antibióticos que ataquen esos sitios o receptores específicos (de Lima Procópio et al., 2012a).

2.3 *Streptomyces* spp.

Streptomyces spp. son actinobacterias filamentosas Gram positivas (Bizuye, Moges, & Andualem, 2013). Su presencia es cosmopolita debido a que se encuentran tanto en zonas urbanas como rurales, bióticas como abióticas (Bizuye *et al.*, 2013) pero son abundantes principalmente en tierra y cuerpos de agua (Rashad, Fathy, El-Zayat, & Elghonaimy, 2015).

Tienen un desarrollo complejo multinuclear en el cual las esporas forman hifas con micelio aéreo. Dicho micelio consta de septos a intervalos regulares que forman esporas uninucleares (Bizuye *et al.*, 2013). La resistencia de las esporas en ambientes difíciles se da debido a la producción de pigmentos que las protegen de la radiación ultravioleta y aroma que estimula el desarrollo celular y excreción de metabolitos secundarios por el área apical de la punta de las hifas (Bizuye *et al.*, 2013).

Se ha estudiado que estas bacterias producen múltiples sustancias de importancia humana entre las cuales se encuentran los antifúngicos, antitumorales, antihipertensivos, inmunosupresivos y antibióticos (de Lima Procópio *et al.*, 2012a). Cada metabolito es específico por especie y los antibióticos son vitales ya que son utilizados como protección contra ataques de otros microorganismos, o para la protección de plantas cuando están en condición de simbiosis. Aún quedan muchas cepas por estudiar, entre las cuales posiblemente existen nuevas moléculas para la biología que puedan ayudar a combatir la deficiencia de antibióticos efectivos (de Lima Procópio *et al.*, 2012a).

3. Marco Metodológico

3.1 Sitio de recolección y obtención de las muestras

La recolección de las muestras de suelo (0-10 cm) se llevó a cabo con tubos de 1.5 mL estériles (Kharel *et al.*, 2010). Los tubos se abrieron lo menos posible y se llenaron de suelo hasta el tope, luego se cerraron las tapas y se trasladaron al laboratorio. La colecta fue en los alrededores de río Pirro, del Campus Omar Dengo de la Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica, (9°59'56"N 84°06'41"O).

3.2 Procesamiento de las muestras y aislamiento

Se disolvieron 200 mg de tierra en 500 μ L de agua destilada estéril y se agitó en vórtex durante 1 minuto (Kharel *et al.*, 2010). Luego, la muestra se calentó en bloque térmico a 80°C por 30 minutos para eliminar las células bacterianas y mantener únicamente las esporas. Seguidamente se hicieron diluciones seriadas hasta el orden de 10^{-3} , utilizando agua desionizada estéril, para reducir la carga bacteriana y facilitar la visualización de las colonias de actinomicetos si están presentes en tres tipos de agares.

Los agares selectivos utilizados fueron agar avena, M2 e ISP4. El agar avena se preparó a una composición de 60g/L de avena y 12.5 g/L de Agar Agar, y el pH de este es ajustado a 6.0 con NaOH 1 M y HCl 1 M antes de esterilizar con autoclave. Agar M2 está compuesto por 4 g/L de glucosa, 10 g/L de extracto de malta, 4 g/L de extracto de levadura, 1 g/L de carbonato de calcio y 15 g/L de Agar Agar (pH = 7.2, ajustado con NaOH 2 M antes de ser esterilizado). Finalmente, el agar ISP4 contiene 10 g/L de almidón soluble, 1 g/L de fosfato dipotásico, 1 g/L de sulfato de magnesio, 1 g/L de cloruro de sodio, 2 g/L de sulfato de amonio, 2 g/L de carbonato de calcio, 20 g/L de Agar Agar, 0.01 g/L de sulfato ferroso, 0.001 g/L cloruro de manganeso, 0.001 g/L de sulfato de zinc (pH = 7.2, ajustado con NaOH 1 M y HCl 1 M antes de ser esterilizado). Todos los agares fueron suplementados con Ciloheximida y Ácido Nalidíxico a 100 μ g/mL.

Los cultivos se incubaron a 28°C por 12 días y posteriormente se hicieron tinciones de Gram para confirmar que las células bacterianas correspondieron a Gram positivos. Luego del tiempo de incubación, los microorganismos se identificaron por morfología de las bacterias obtenidas, y se seleccionaron aquellos morfotipos coloniales característicos de *Streptomyces* spp. como forma tubular de micelio y esporas circulares flotantes (Anuniação, Sousa, & Olivares, 2016; Duncan, Haltli, Gill, & Kerr, 2014).). Luego se hicieron repiques por agotamiento en tres zonas en agar nutritivo para purificar los cultivos (Kharel *et al.*, 2010) y se criopreservaron en caldo cerebro corazón con glicerol al 20%. Los aislamientos axénicos se repicaron en agar ISP4 para la caracterización de *Streptomyces* spp. (Shirling & Gottlieb, 1966) y se incubó por 12 días, a 28°C para observar y fotografiar la morfología de cada aislamiento obtenido..

3.3 Prueba de sensibilidad

La prueba de sensibilidad se hizo por triplicado acorde con Balouiri, Sadiki, e Ibsouda, (2016) y se probó cada aislamiento de *Streptomyces* spp. contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* silvestre obtenido a partir de un aislamiento clínico y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Se prepararon placas de Petri con 25 mL de agar Mueller Hinton (BD®), y en la zona delimitada de 1 cm de ancho (Figura 1) se inoculó cada uno de los 19 aislamientos presuntivos de actinomicetos en placas individuales, y se incubaron por un periodo de 14 días a 25°C. Posterior a la incubación, con cada cepa ATCC de patógenos utilizados de forma estándar en ensayos de desinfección se prepararon 5mL de suspensión bacteriana, equivalentes a un estándar de McFarland 0.5 con el uso del espectrofotómetro, en el cual se requirió alcanzar una densidad óptica (OD) entre 0.08-0.10 de absorbancia (A) a una longitud de onda de 600 nm (Sutton, 2011).

Luego, en cada placa se ejecutó un rayado que consistió en trazar una línea de 2 cm de forma perpendicular a *Streptomyces* spp. con el asa bacteriológica, dejando un espacio de 0.5 cm entre el actinomiceto seleccionado y la cepa patógena y 2 cm entre las réplicas (Figura 1). Se trabajó con un patógeno en cada placa Petri. Las placas se incubaron por 24h a 37°C, y luego se tomaron fotografías para registrar el diámetro de crecimiento del patógeno enfrentado al aislamiento evaluado con ayuda de un analizador de imágenes (ver sección 3.8, análisis estadístico), y posteriormente calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno.

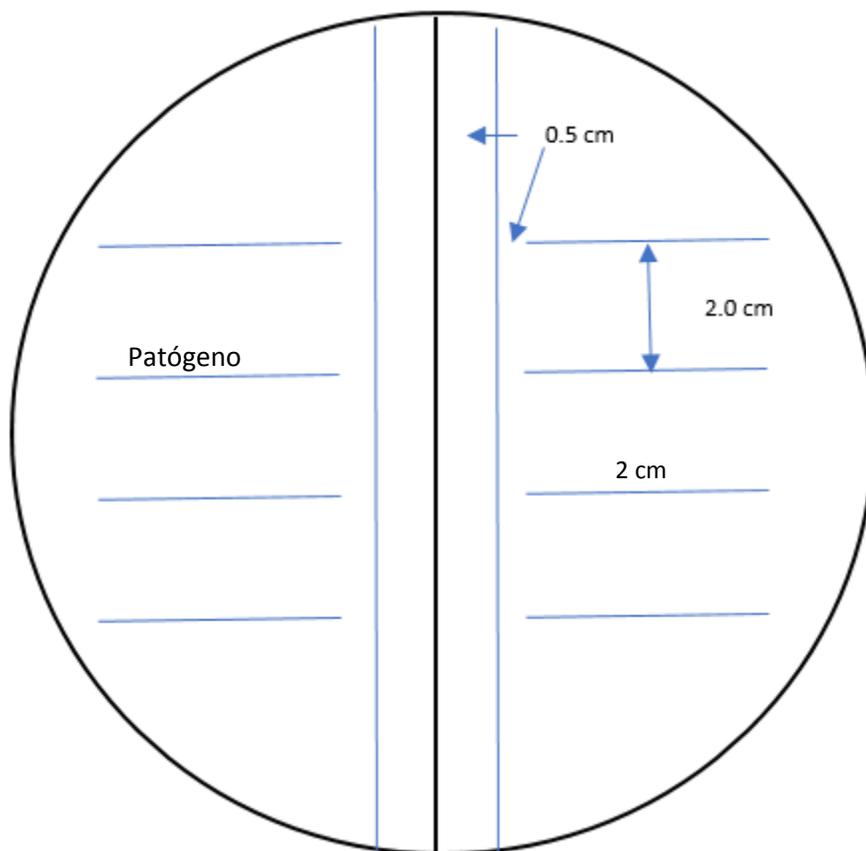


Figura 1. Esquema del ensayo de sensibilidad microbiana a través de co-cultivo, mostrando una representación de la placa con medio de cultivo utilizada en los ensayos propuestos. El actinomiceto se ubicó en la zona central demarcada con 1cm de ancho y las cuatro rayas paralelas de 2 cm cada una, a cada lado indican el sitio donde se ubicaron los patógenos inoculados.

3.4 Fermentación sólida y purificación de extracto

Se hizo un cultivo axénico de cada uno de los ocho aislamientos promisorios y se incubó por 14 días a temperatura ambiente. Se tomaron esporas para inocular un césped en agar Mueller-Hinton y se incubaron por 14 días a 25° (Ibnsouda *et al.*, 2015). Posteriormente, se rompió todo el agar de la placa con asa micológica y se introdujo en un tubo cónico de 50 mL el cual se mezcló por separado con 10 mL de solventes: dimetilsulfóxido, acetonitrilo y metanol los cuales son polares (Quintero *et al.*, 2018; Macgregor, 1962; H. Park *et al.*, 2002). Como control negativo se utilizó una placa sometida a las mismas condiciones, pero sin esporas inoculadas y agua destilada estéril en vez de un solvente químico. Cada extracto crudo se dejó en reposo por 24 horas a 4°C

y se trasvasó. Posteriormente se utilizó en el método de difusión en agar por pozos para probar la capacidad de inhibición de los extractos (Balouiri *et al.*, 2016).

3.5 Fermentación líquida y purificación de extracto

Los aislamientos promisorios escogidos a partir de la prueba de sensibilidad fueron inoculados para obtener cultivos axénicos. A partir de estos se extrajeron esporas y se inocularon en placas individuales con agar Mueller Hinton en forma de césped para ser incubados 14 días a 25°C. Se tomó media placa de agar de cada uno de los aislamientos de *Streptomyces* spp. escogidos y se introdujo en un Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio líquido Mueller Hinton y un frasco por aparte con 50 mL de medio Mueller Hinton, el cual fue utilizado control negativo (en el cual no va a haber inóculo). Los frascos se incubaron con agitación orbital a 200 rpm bajo una condición de 25°C y por un periodo de siete días. Posteriormente, se tomaron 4 mL del medio fermentado y se centrifugaron a 12 000 g por 5 minutos. Luego, 2 mL de sobrenadante fueron transferidos con pipeta a tubos de centrífuga de 5 mL previamente esterilizados para adicionar 3 mL de alguno de los tres solventes (dimetilsulfóxido, metanol y acetonitrilo). Los tres extractos con solvente, el extracto sin solvente y el control se dejaron reposar 24 h en refrigeración (4 °C) y luego se utilizó el en método de difusión en agar por pozos para probar la capacidad de inhibición de los extractos.

3.6 Método de difusión por tapón de agar

Para desarrollar el presente ensayo, se tomaron en cuenta dos variables que fueron nombradas: tipo de cultivo dual (correspondiente al enfrentamiento del aislamiento de *Streptomyces* spp. y el patógeno) y método aplicado (tapete o raya). Los aislamientos de *Streptomyces* spp. fueron inoculados en placas con medio Mueller Hinton bajo los dos métodos diferentes correspondientes a cultivo por tapete e inoculación por raya. La primera condición fue un rayado continuo hasta que el actinomicete alcanzara el crecimiento de un césped (Tapete), tal y como se explicó en la sección anterior. Por otro lado, la segunda condición consistió en inocular la bacteria en una placa con medio Mueller Hinton con un espacio demarcado de 1 cm de ancho en el centro de la placa de Petri (raya), tal y como se describió en la sección 3.3 (Figura 2). Todas las placas fueron

incubadas por 14 días a 25°C. Las placas de la segunda condición fueron inoculadas con las bacterias patógenas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* silvestre obtenido a partir de un aislamiento clínico y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) e incubadas 24h a 37°.

El establecimiento de los cultivos duales se llevó a cabo en placas con medio Mueller Hinton por triplicado, y fueron inoculados con 100 µL de una suspensión equivalente al McFarland 0.5, de cada bacteria patógena, preparado a partir de las lecturas obtenidas del espectrofotómetro (OD = 600 nm, A = 0.08 – 0.10), lo cual describe la variable mencionada como tipo de cultivo dual. Cada plato se dividió en dos secciones con marcador en la base y en cada lado se dispusieron dos tapones de agar obtenidos de las placas sometidas a las condiciones llamadas “raya” y “tapete” a una distancia de 2 cm. Después de 24h se registraron fotografías de los cultivos duales. El crecimiento de los halos de inhibición se midió en centímetros y se cuantificó con un programa de análisis de imágenes (detallado en la sección de análisis estadístico 3.8).

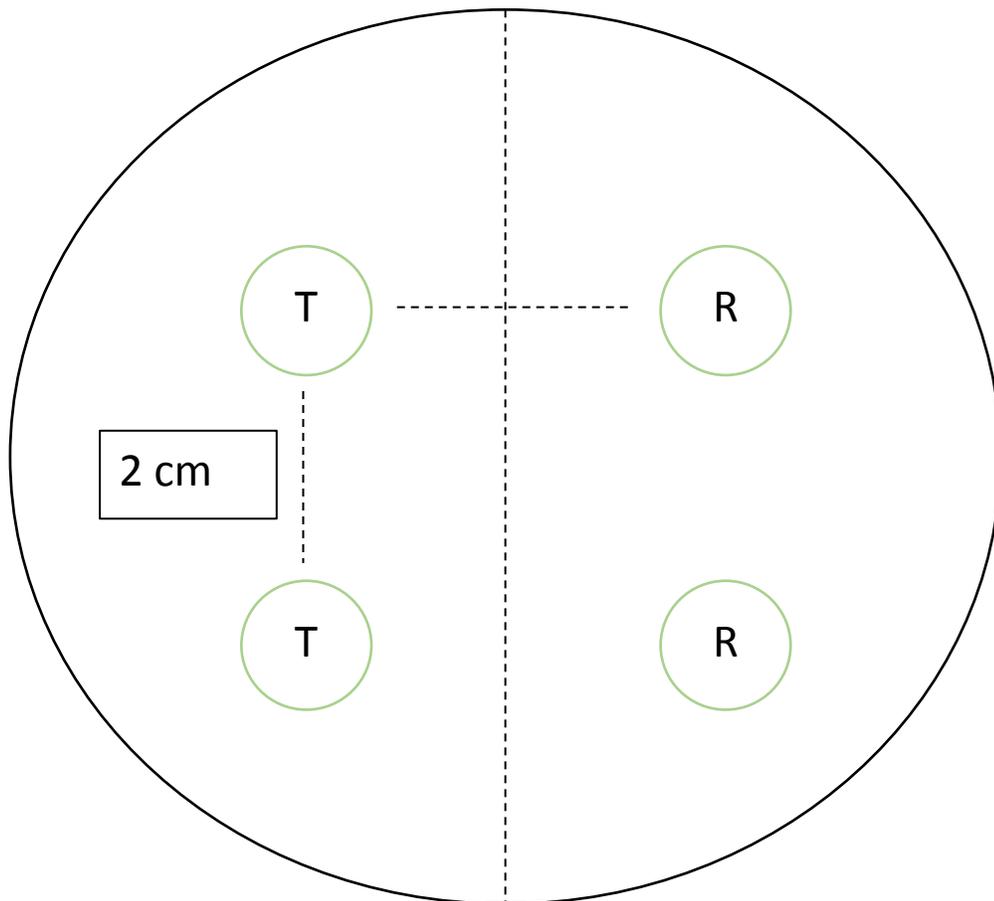


Figura 2. Esquema del ensayo de difusión por tapón de agar, mostrando una representación de la placa con medio de cultivo utilizada en los ensayos propuestos. “T” representa tapete y “R” representa Raya y los tapones se encuentran a una distancia de 2 cm entre cada uno.

3.7 Método de difusión en agar por pozos

Este método se llevó a cabo por triplicado tanto para las extracciones de la fermentación sólida como la líquida para los aislamientos.

El ensayo se realizó por triplicado mediante la técnica de difusión en pozos en placas de agar (Balouiri *et al.*, 2016). Se preparó un Macfarland 0.5 con espectrofotómetro (OD = 600 nm, A = 0.08 – 0.10) en solución salina estéril al 0.85% para cada cepa patógena. Se inoculó 100 µL en placas Petri plásticas estériles de 90 mm de diámetro y sobre ellas se vertió 25 mL de agar Mueller Hinton fundido a 45°C, se homogeneizó y dejó solidificar. Posteriormente, se perforaron cuatro hoyos utilizando la técnica aséptica con el reverso de una pipeta Pasteur estéril (Figura 3) y entre cada uso, la misma fue desinfectada con etanol y bajo la flama. Por placa se evaluó cada extracto hecho con los tres solventes, así como el extracto sin solvente en el cuarto hoyo. Se agregó 50 µL de cada extracto, mientras que en el cuarto hoyo se agregó 50 µL de extracto sin solvente.

Los controles se prepararon por separado y consistieron en placas de Mueller Hinton con cuatro hoyos equidistantes en los cuales se analizaron los solventes. Además, se estableció un control positivo en el cual cada bacteria patógena fue enfrentada contra 50 µL de la mezcla de antibióticos penicilina/estreptomicina (1000ug/mL, Gibco). Los tratamientos se incubaron por 24h a 37°C y posterior tomaron fotografías, y mediante un analizador de imágenes se cuantificaron los diámetros de los halos de inhibición en centímetros.

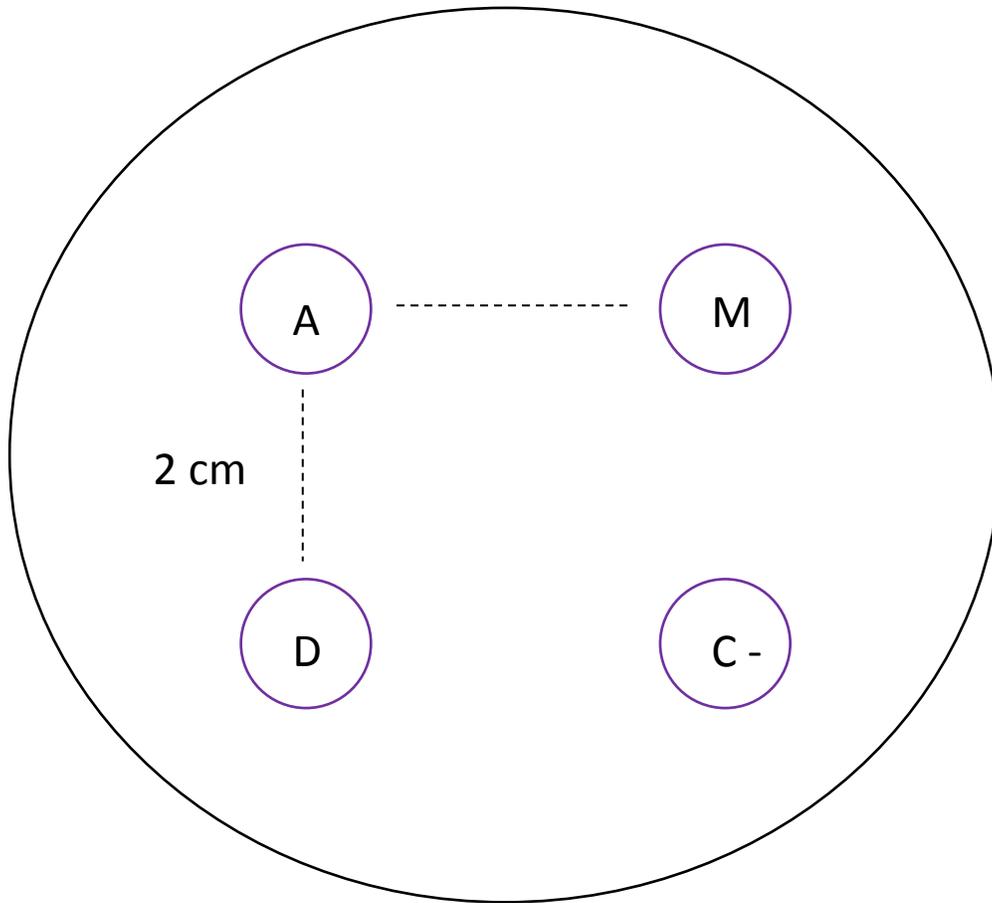


Figura 3. Esquema del ensayo de difusión por pozos, mostrando una representación de la placa con medio de cultivo utilizada en los ensayos propuestos. “A” representa acetonitrilo, “D” DMSO y “M” se refiere a metanol mientras que “C-” hace referencia a control negativo. Los pozos se encuentran a una distancia de 2 cm entre cada uno.

3.8 Análisis estadístico

Cada una de las fotografías registradas fueron analizadas con el programa ImageJ, versión 1.52a. De los resultados base obtenidos, se construyó un mapa de calor para visualizar y reconocer fácilmente cuáles fueron los aislamientos que alcanzaron mayor porcentaje de inhibición, utilizando el paquete *ClustVis* del programa estadístico R

Todos los datos cuyo valor fuese equivalente a cero fueron eliminados ya que no permitieron un ajuste a la distribución gaussiana (Figura 5). Además, estos valores no aportaron información relevante y generaron ruido en el análisis.

Se determinaron los supuestos de normalidad para aplicar pruebas paramétricas, particularmente la normalidad de los datos crudos y la homogeneidad de varianzas/homocedasticidad. Para definir la normalidad de los datos crudos se utilizó la prueba Anderson-Darling ($p > 0.05$), o la prueba Kolmogorov-Smirnov ($p > 0.05$); mientras que para determinar la homocedasticidad se aplicó la prueba de Levene ($p > 0.05$). Dado que, para el primer ensayo de sensibilidad, así como el ensayo en el que se evaluaron varios solventes no se alcanzó la normalidad de los valores crudos, se procedió a llevar a cabo pruebas no paramétricas; mientras que en el ensayos de difusión por tapón de agar sí se alcanzaron los supuestos de normalidad, pero como se tenían dos variables predictoras (tipo de co-cultivo y método aplicado) se aplicó un modelo lineal general.

Para los ensayos: prueba de sensibilidad y prueba de difusión en agar por pozos, debido a que no se logró cumplir el supuesto de normalidad a pesar de evaluar posibles métodos de transformación de los datos, se procedió a aplicar pruebas no paramétricas. Para ello, se utilizó la prueba de Wilcoxon de comparación en pares ($p < 0.05$) para evaluar cada tratamiento en relación con su control positivo, el cual correspondió al crecimiento alcanzado por las cepas patógenas mantenidos en cultivos axénicos, y cuyo crecimiento promedio no superó los 2 cm que es el límite máximo que se podía alcanzar en el espacio de las placas con medio MH, los cuales fueron analizados por triplicado ($r = 3$). Además, se ejecutó la prueba de Kruskal-Wallis para determinar diferencias entre los tratamientos globales haciendo comparaciones para cada uno de los co-cultivos evaluados, y la prueba de Mood para definir la mediana y el rango intercuartil de las comparaciones obtenidas en la prueba de Kruskal-Wallis, y así establecer un criterio de separación con letras capitales para definir cuán significativos fueron los tratamientos a partir de los valores de significancia.

Para definir si existieron diferencias significativas entre los tratamientos (todos los cultivos duales) y entre cada tratamiento y el control, fuese una prueba paramétrica o no paramétrica, se utilizó como criterio si en las pruebas ejecutadas se alcanzó un valor de probabilidad inferior de 0.05 (con un valor umbral $\alpha = 5\%$) (Bizuye et al., 2013). Además, para el ensayo de difusión por tapón de agar se aplicó un modelo lineal generalizado donde además de validar los supuestos de normalidad y homocedasticidad,

también se determinaron los supuestos de linealidad de las variables predictoras y la variable respuesta, correspondiente al crecimiento en centímetros del patógeno enfrentado al actinomicete y la normalidad de los residuos estudentizados. Cada uno de los análisis estadísticos se llevó a cabo con el programa Minitab 17®.

4. Resultados

4.1 Procesamiento de las muestras y aislamiento

Empleando la metodología descrita, se lograron recuperar 19 aislamientos con características morfológicas de *Streptomyces* spp. (ejemplos de algunos aislamientos cultivados en las Figura 2 y 3).

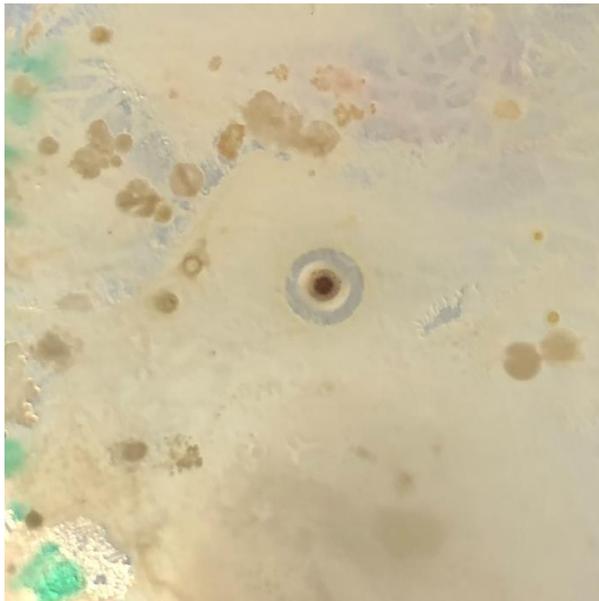


Imagen 1. Aislamiento primario de *Streptomyces* spp. encontrada a partir del procesamiento de las muestras de tierra y aislamiento en agar avena de la dilución 10^{-3} , incubada por 12 días a 28° , mostrando actividad antibiótica en los aislamientos primarios.

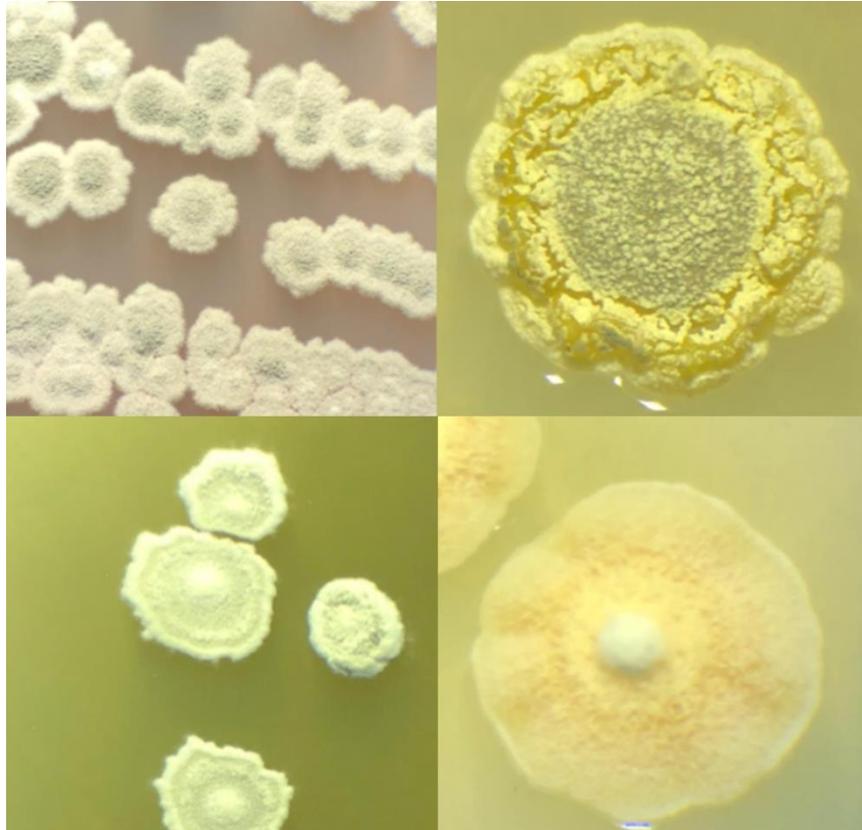


Imagen 2. Repicado de los aislamientos puros de *Streptomyces* spp. en agar ISP4, incubados por 12 días a 28 °C

4.2 Prueba de sensibilidad

La figura 4 muestra un mapa de calor de los ocho aislamientos que alcanzaron inhibición en el ensayo hecho para la prueba de sensibilidad. Este mapa agrupó los aislamientos en función de la fuerza o porcentaje de inhibición, donde en la parte inferior del mapa se ubicaron las cepas patógenas, del lado derecho los aislamientos y el izquierdo presenta una agrupación en función a la semejanza de la actividad inhibitoria entre los diferentes aislamientos evaluados. Los cuadros con tonos de rojo más oscuro representan aquellos aislamientos que presentaron mayor fuerza de inhibición (determinada a partir de los valores ascendentes de porcentajes de inhibición) y los azules o tonos claros representaron menor actividad inhibitoria (Figura 4). Además, los aislamientos en la parte superior también mostraron mayor actividad inhibitoria, contraria a los que se encontraron en la parte inferior.

Basados en los resultados de la figura, se observó que los aislamientos con los códigos S9 y S19 exhibieron un mayor espectro de inhibición porque pudieron inhibir al menos parcialmente a tres bacterias patógenas, mientras que el resto de los aislamientos se limitaron a inhibir principalmente a la cepa de *S. aureus*. S9 inhibió a *S. aureus*, *E. coli* y *K. pneumoniae* con un promedio de 59%, 100% y 38% mientras que S19 en 100%, 53% y 49% respectivamente.

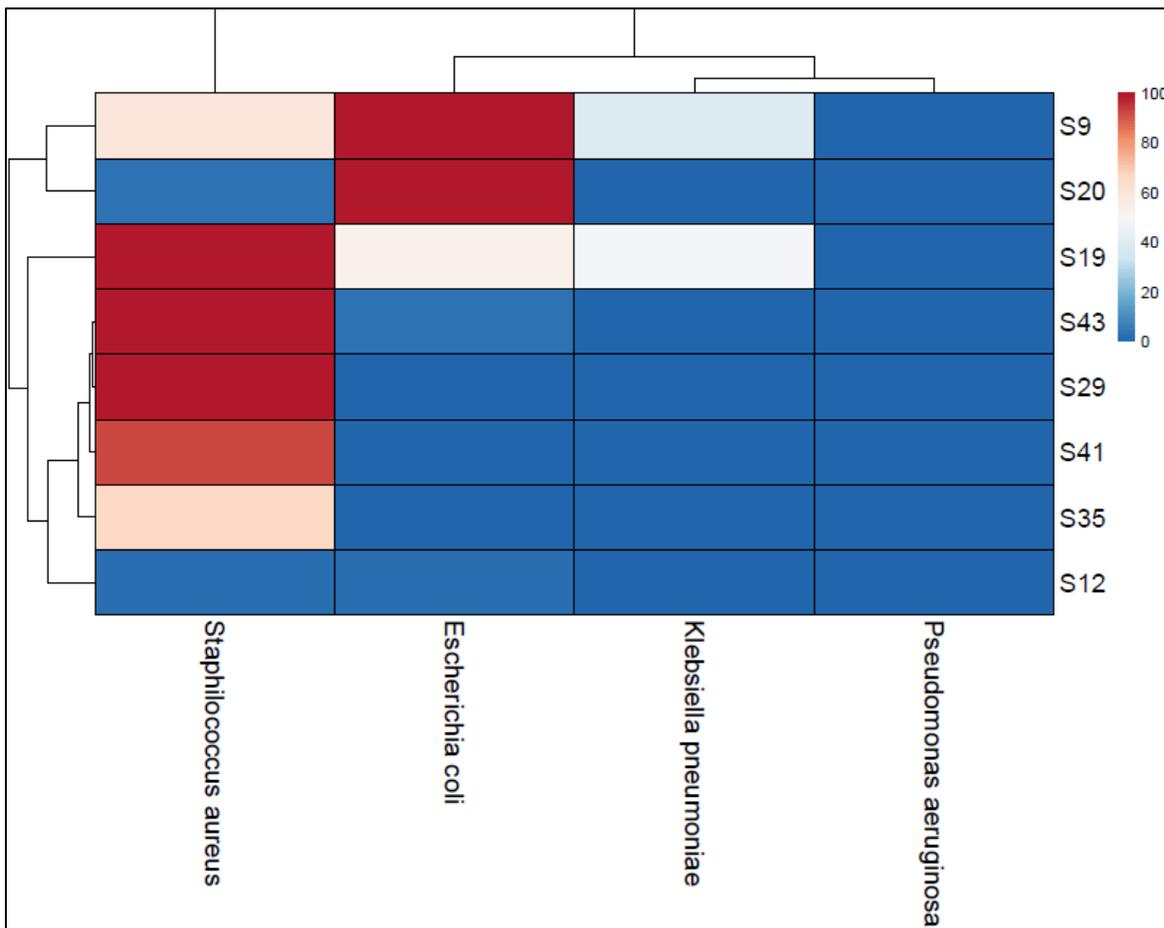


Figura 4. Mapa de calor con clúster jerárquico basado en el algoritmo de Manhattan con los resultados de porcentaje de inhibición derivados de la prueba de sensibilidad de ocho aislamientos de *Streptomyces* spp. obtenido de muestras de suelo, y evaluados mediante cultivo dual contra las bacterias patógenas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*.

A partir de los resultados de crecimiento de los patógenos derivado de la prueba de sensibilidad se evaluaron los supuestos para aplicar pruebas paramétricas. Según la prueba de normalidad Anderson-Darling (Figura 5) se pudo determinar que se obtuvieron valores de

la media y la mediana similares. Sin embargo, los datos crudos no fueron simétricos ($AD = 7.97, p < 0.05$) y la distribución de frecuencias sugirió que no se cumplió el supuesto de normalidad del conjunto de datos crudos. Por su parte, la prueba de Kolmogorov-Smirnov ($KS = 0.288, p < 0.05$) permitió confirmar que no hubo normalidad de los datos. Por su parte, la prueba de Levene ($L = 1.41, p = 0.163$) permitió definir que sí se alcanzó homogeneidad de varianzas entre los diferentes tratamientos o condiciones evaluadas.

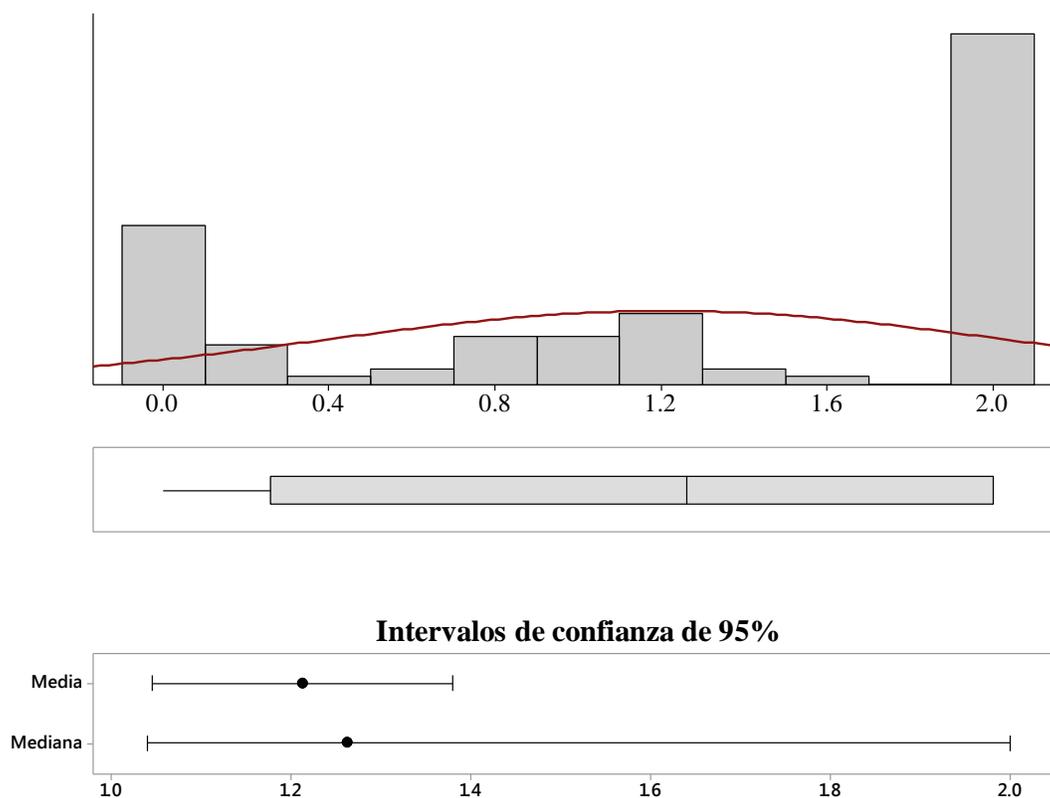


Figura 5. Representación gráfica de un histograma con el resultado obtenido la prueba de Anderson-Darling para evaluar la normalidad y simetría de los datos, así como el intervalo de confianza y la media aritmética obtenida para los datos crudos derivados de la prueba de sensibilidad.

Dada la falta de normalidad en los datos, se procedió a aplicar la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la mediana de Mood, y los resultados asociados a KW ($H = 75.58, p < 0.001$) y Mood ($\text{chi-cuadrado} = 84.00, p < 0.001$), cuyos resultados revelaron que se debe rechazar la hipótesis nula (H_0), y se asumió que no todos los valores de la mediana asociados al crecimiento de *Streptomyces* resultaron ser iguales, lo cual sugirió que existen

diferencias significativas en relación con el grado de inhibición ejercido por cada aislamiento analizado.

La prueba de Wilcoxon permitió averiguar que, por un lado, el aislamiento con el código S20 evaluado en cultivo dual junto con *Escherichia coli*, así como los bioensayos de S12, S19, S29 y S43 con *Staphylococcus aureus* generaron resultados consistentes e idénticos al control positivo, en relación con el crecimiento alcanzado por el patógeno. Por su parte, al evaluar S9 contra *Klebsiella pneumoniae* ($p = 0.059$) (Figura 6), S35 y S41 contra *Staphylococcus aureus* ($p = 0.371$ para ambos) no se observaron diferencias significativas del control positivo en relación con el crecimiento resultante de los patógenos en la placa de Petri con el medio Mueller Hinton.

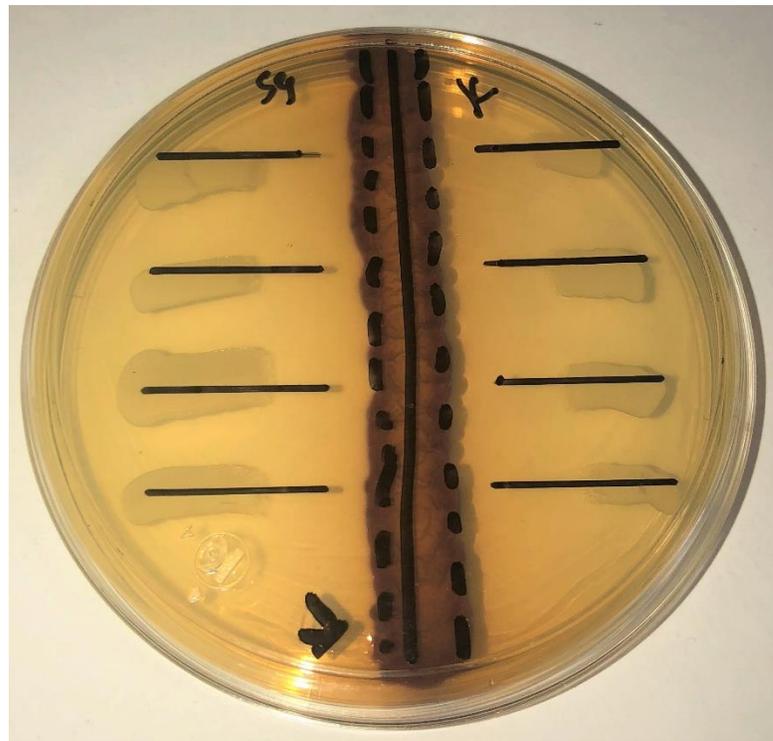


Imagen 3. Imagen representativa de cribado del aislamiento S9 contra *Klebsiella pneumoniae* en medio MH. *Streptomyces* spp. se incubó por 14 días a 25°C y la bacteria de uso estandarizado por 24h a 37°C, se observa la inhibición que ejerce *Streptomyces* spp. sobre la bacteria patógena.

4.3 Método de difusión por tapón de agar

Para poder ejecutar un modelo lineal general, se validaron primero algunos supuestos con base en los residuos y la homocedasticidad de los datos (Figura 7 y 8). Al aplicar el modelo, se determinó que ambas variables predictoras que correspondieron al método (tapete o raya) y el tipo de co-cultivo analizado fueron significativas (método aplicado: $F = 4.89$, $p = 0.030$, tipo de cultivo dual: $F = 926.30$, $p < 0.001$) y no deberían ser eliminadas del modelo. Por otra parte, el modelo alcanzó un ajuste superior de 99%; lo cual sugiere que el modelo lineal general propuesto (basado en 2 variables de predicción: método y co-cultivo, y la variable respuesta: crecimiento del co-cultivo enfrentado en cm) se ajusta apropiadamente.

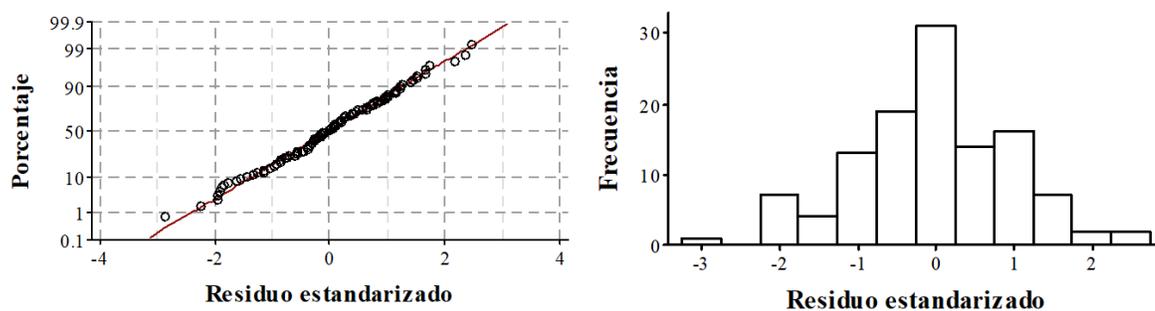


Figura 6. Validación de los supuestos de linealidad de los residuos y homocedasticidad para aplicar el modelo lineal general en los datos crudos de la prueba de difusión por tapón de agar, en el cual se observa que todos los intervalos de confianza asociados a los co-cultivos evaluados en esta prueba presentaron traslape, por lo cual si hay homocedasticidad.

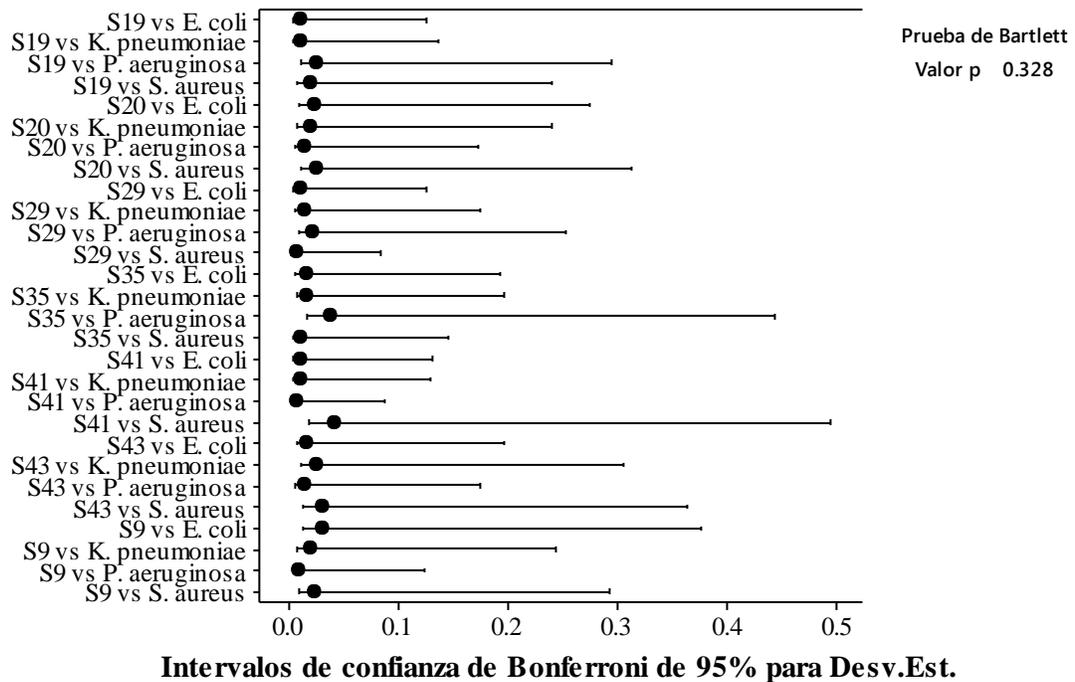


Figura 7. Validación del supuesto homocedasticidad del modelo lineal general en el cual se observa que todos los intervalos de confianza tienen traslape por lo cual si se puede inferir que existe homocedasticidad.

Con los resultados del análisis de varianza con las dos variables consideradas (tipo de cultivo dual y método aplicado), se determinó que en el modelo, ambas variables resultaron ser significativas en relación con el valor de crecimiento en los co-cultivos, tanto el tipo de cultivo ($F = 926.30, p < 0.001$) como el método utilizado ($F = 4.89, p = 0.030$), siendo ambas variables responsables de explicar el 99.65% de la variación entre los grupos asociados a la variable dependiente. Esto indica que se obtuvo menos de 1% de la variabilidad dentro de grupos o variabilidad no controlable asociada por el error; respectivamente.

A partir del modelo lineal general establecido, se determinó que al comparar los diferentes co-cultivos en relación con el control positivo correspondiente a la mezcla de antibióticos de penicilina y estreptomycin (Pen-Strep), ninguno de los co-cultivos resultó ser significativamente similar a éste, pero los que más se acercaron a los valores obtenidos por la mezcla Pen-Strep fueron los tratamientos S41 vs *Staphylococcus aureus*, S43 vs *Staphylococcus aureus*, y S19 vs *Pseudomonas aeruginosa*; mientras que los cultivos duales que generaron una respuesta diferente y baja en relación con el control fueron los cultivos

duales S43 vs *Escherichia coli*, S35 vs *Pseudomonas aeruginosa*, S20 vs *Klebsiella pneumoniae* y S9 vs *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 9).

Por su parte, al comparar un método de cultivo en relación con el otro (raya vs tapete), la prueba *post-hoc* de Fisher reveló que sí existen diferencias significativas entre ambos métodos ($p= 0.032$) a pesar de que los promedios son muy cercanos. El método de tapete (promedio = 0.39 cm) alcanzó un mayor diámetro de los halos de inhibición en los co-cultivos, comparado con el método de raya (promedio = 0.38 cm) y el co-cultivo que generó el mayor grado de inhibición fue S41 vs *Staphylococcus aureus*. Todos los promedios obtenidos en esta prueba fueron muy cercanos entre sí, pero una pequeña diferencia fue fácilmente detectable por la prueba estadística del GLM, lo cual permite inferir que cada co-cultivo presentó diferencias en relación con la actividad antimicrobiana ejercida sobre los patógenos considerados en el presente estudio.

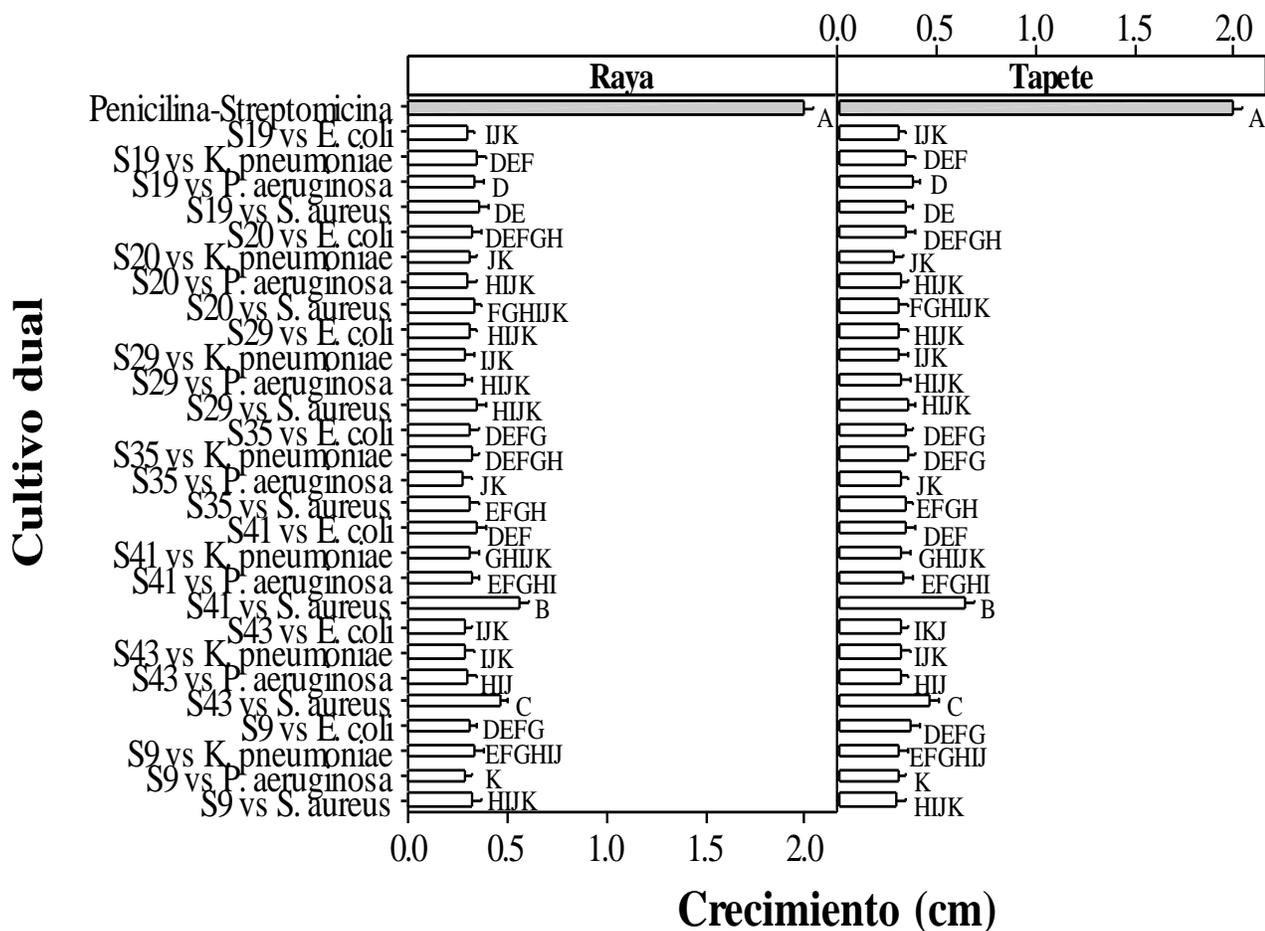


Figura 8. Crecimiento alcanzado por los co-cultivos de los aislamientos promisorios de suelo obtenidos de *Streptomyces* spp. y cepas patógenas (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*) en medio de cultivo Mueller Hinton, comparando los métodos de “raya” y “tapete” para ambos casos. Las letras capitales diferentes a la par de cada barra indican diferencias significativas entre cada tratamiento, de acuerdo con la prueba de Fischer. La barra coloreada en tonalidad de gris corresponde al control positivo Pen-Strep, mientras que las barras en color blanco corresponden a los diferentes co-cultivos evaluados como tratamientos.

4.4 Método de difusión en agar por pozos

En la Figura 10 se observan los halos de inhibición de los tratamientos de co-cultivos S41 vs *S. aureus* el cual junto a S43 vs *P. aeruginosa* fueron los únicos dos tratamientos que se evaluaron estadísticamente ya que los demás resultados de los restantes cultivos duales presentaron valores equivalentes a cero, dado que no hubo inhibición. Por su parte, la Figura 11 permite observar que el acetonitrilo resultó el mejor solvente para la extracción de metabolitos secundarios provenientes tanto de la fermentación sólida como líquida de los aislamientos de *Streptomyces* sp.

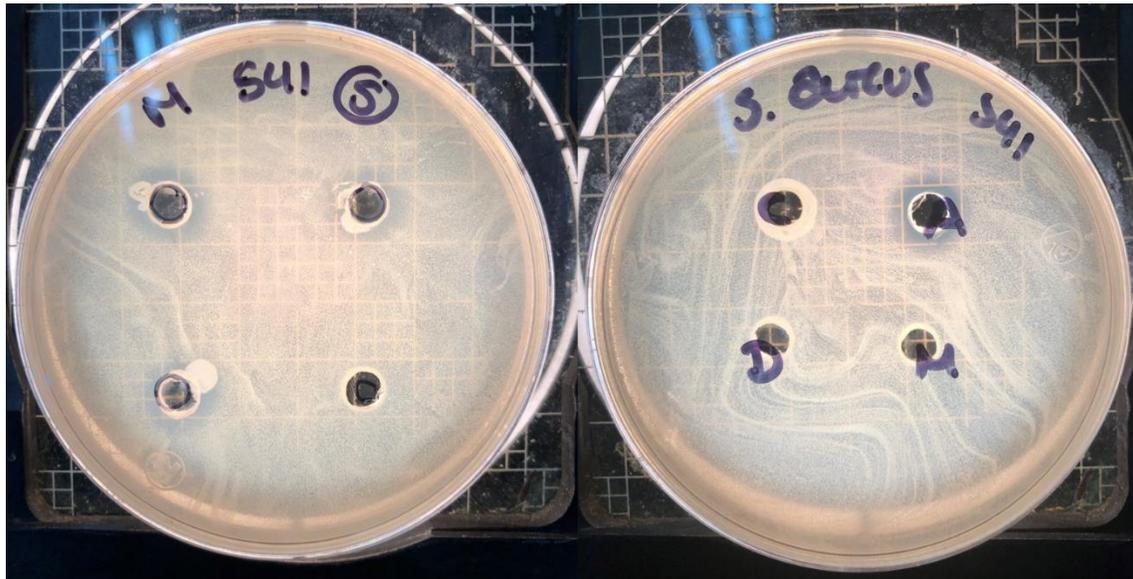


Imagen 4. Imagen de la fermentación sólida (derecha) y líquida (izquierda) del aislamiento S41 contra la bacteria patógena *Staphylococcus aureus* en medio MH. Las bacterias patógenas fueron inoculadas en el medio e incubadas por 24h a 37°C y posteriormente se hicieron los pocillos a los cuales se les agregó 50µl de cada solvente.

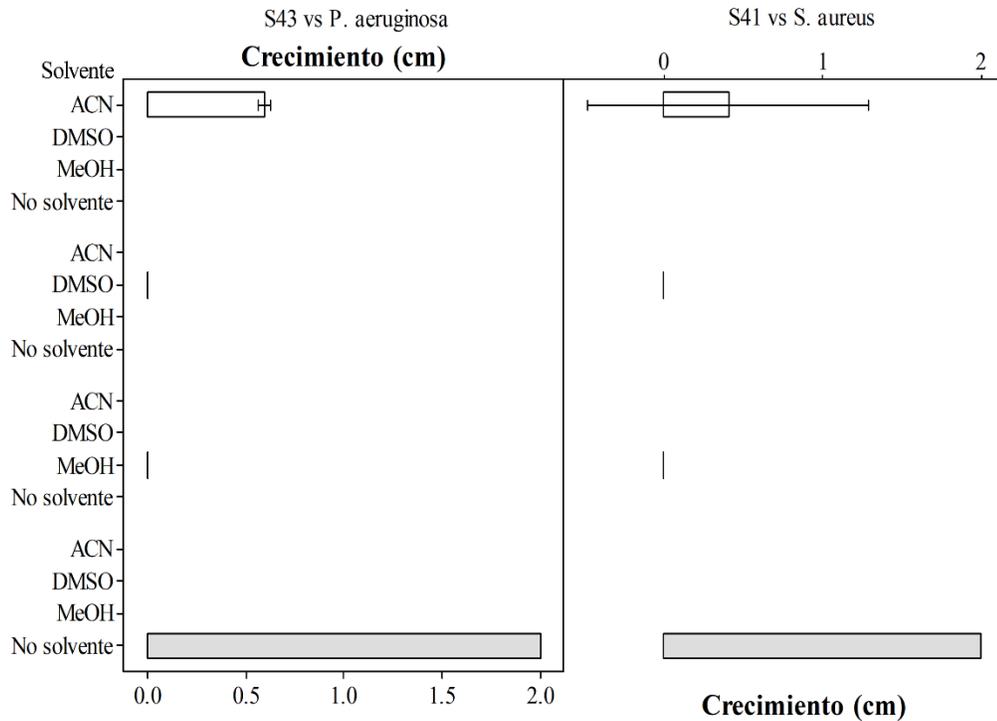


Figura 9. Gráfica de barras con los tratamientos crecidos en medio líquido, separados por cada solvente utilizado para extraer los metabolitos, posterior al proceso de fermentación. En el eje izquierdo se observan los solventes utilizados: Acetonitrilo (ACN), Dimetilsulfóxido (DMSO), Metanol (MeOH) y el control en el cual no se utilizó solvente, solo se dejó caldo de fermentación

Mediante una prueba de Anderson-Darling se evaluó normalidad de los co-cultivos S43 vs *P. aeruginosa* y S41 vs *S. aureus* y se obtuvo que ninguno mostró normalidad en la distribución de frecuencias de los datos crudos ($AD = 1.47, p < 0.05$; $AD = 1.75, p < 0.05$), a pesar de que en ambos sí se alcanzó homocedasticidad ($p < 0.05$)

Por consiguiente, se procedió a verificar mediante una prueba de hipótesis si las medianas resultaron ser o no iguales, por lo que para los resultados de este ensayo también se aplicaron las pruebas no paramétricas Kruskal-Wallis (KW) y Mood. Los resultados asociados al co-cultivo S43 vs *P. aeruginosa* con KW ($H = 9.35, p = 0.05$) y Mood ($\chi^2 = 12.00, p < 0.001$), así como S41 vs *S. aureus* evaluado con KW ($H = 7.62, p = 0.05$) y Mood ($\chi^2 = 9.26, p < 0.05$) revelaron que se debe rechazar la hipótesis nula, por lo que se asume que los co-cultivos no exhibieron un crecimiento equivalente al control positivo. Esto fue un resultado no esperado ya que se pretende buscar extractos con potencial actividad inhibitoria.

5. Discusión

Según Parte (2018), se han identificado alrededor de 500 especies del género *Streptomyces* las cuales se encuentran principalmente en el suelo, ya que se ha visto que son más prósperos en ambientes alcalinos (Terra et al., 2018), aunque también hay de origen marino. A pesar de que la recolección y aislamiento que se llevó a cabo fue a pequeña escala por los alcances de la tesis, se lograron 19 aislamientos de actinomicetos con características morfológicas de *Streptomyces* spp. como colonias circulares, con pigmentos entre amarillo y café y micelio aéreo pulverulento o esponjo, similar a lo encontrado por Leon *et al.* (2011).

A partir de los resultados de crecimiento obtenido, la elección de los medios selectivos fue la correcta, ya que contribuyó con la selección de los aislamientos de *Streptomyces* spp. El agar avena, es comúnmente utilizado para aislar actinomicetos debido a promueve esporulación (Lemus Angulo, J. A. 2019). Además, permite que su optimización al modificar pH o agregar antibióticos sin sufrir ningún cambio negativo (Lemus Angulo, J. A. 2019). El segundo medio selectivo correspondió a agar M2, el cual es un medio de cultivo semisintético utilizado comúnmente para el recuento general en placas (HIMEDIA, 2015). Finalmente, el agar ISP4 es parte de los cuatro medios estándares recomendados por Shirling & Gottlieb (1966) para la identificación morfológica de los actinomicetos.

Se han identificado alrededor de 1000 compuestos orgánicos volátiles producidos por *Streptomyces* spp. (Cordovez, Carrion, Etalo, Mumm, & Zhu, 2015) los cuales poseen una variedad de propiedades entre las cuales se encuentran inhibición de crecimiento bacteriana y fúngico (Suárez-Moreno et al., 2019). Estos compuestos pueden ser generales o específicos al género y/o especie y pueden consistir en alquenos, alcoholes, cetonas, terpenos, bencenoides, aldehídos, pirazinas, ácidos, ésteres, y compuestos que contienen sulfuros. (Li et al., 2008). La presencia de algunos de estos compuestos en los aislamientos más promisorios permitiría explicar la eficacia y las diferencias observadas en el mapa de calor para inhibir uno o más patógenos. Mientras que la mayoría de los aislamientos tienen actividad contra *Staphylococcus aureus* únicamente, S9 y S19 presentaron inhibición contra *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Lo encontrado en esta investigación es comparable a un estudio llevado a cabo por Li et al. (2008), con la excepción que no lograron

inhibir *K. pneumoniae* y otro de Terra et al., 2018, en el cual se logró aislar una cepa llamada *Streptomyces* sp. myrophorea capaz de inhibir patógenos ESKAPE.

Los resultados de análisis estadísticos, como la prueba de Wilcoxon permitieron determinar que ciertos aislamientos presentaron resultados idénticos al control positivo cuando se enfrentaron a *E. coli* y *S. aureus*. Los resultados contra *S. aureus* se ajustan a lo reportado en trabajos previos ya que, de los aislamientos obtenidos actualmente, alrededor de 50% presentan algún compuesto activo contra Gram-positivas. (Evangelista-Martínez & Moreno-Enríquez, 2016). Por ejemplo, e-Poli-l-lisina (e-PL) es un péptido catiónico altamente soluble y con una buena estabilidad térmica, se ha encontrado en el material extracelular de bacterias como *Streptomyces albulus*, y se ha descrito como un péptido antimicrobiano natural que inhibe varios microorganismos como bacterias, levaduras y virus. Aunque no se conoce su mecanismo de acción, e-PL ha causado apoptosis dependiente de la concentración del péptido en *S. aureus* ya que debilita la pared de peptidoglicano y aumenta la permeabilidad de la membrana (Tan et al., 2019). Por otro lado, contrario a los resultados de Quintero et al. (2018) y Duncan, Haltli, Gill, & Kerr (2014) donde el porcentaje de inhibición de *E. coli* es bastante bajo, en esta tesis fue significativamente alta en algunos aislamientos. Además, también se ha observado que e-Poli-l-lisina ocasiona daño morfológico y distribución anormal; así como colapso, lisis y membranas ásperas en *Escherichia coli* O157:H7 (Tan et al., 2019) lo cual podría explicar la razón por la que los aislamientos, principalmente S9, S19 y S20, fueron activos para inhibir a este patógeno.

A pesar de que *Klebsiella pneumoniae* se conoce como una bacteria problemática ya que es resistente a carbapenemas y no hay suficientes opciones a nivel de oferta de antibióticos para tratarla (de Lima Procópio, da Silva, Martins, de Azevedo, & de Araújo, 2012b); en este ensayo se encontró que dos aislamientos, S9 y S19 (Figura 1), mostraron capacidad inhibitoria significativamente alta. Adicionalmente, con la prueba de Wilcoxon se demostró que no hubo diferencias significativas entre S9 en relación con el control, es decir, que su comportamiento es similar al antibiótico comercial correspondiente a la mezcla de 1000 µg Penicilina/Estreptomycin. Por otra parte, el análisis de Wilcoxon demostró que hubo diferencias significativas entre S19 y el control positivo a pesar de que el *screening* y mapa de calor difirieron. Este comportamiento no necesariamente refleja que las pruebas

aplicadas son tan robustas, ya que la prueba de Wilcoxon, al ser una prueba no paramétrica, posee menor poder estadístico de predicción en relación con las pruebas paramétricas como t-student o ANDEVA, y la determinación de diferencias estadísticas puede tener un mayor porcentaje de sesgo porque está basado en rangos intercuartiles y no en el intervalo de confianza.

La producción de cada antibiótico es específica por especie por lo cual se necesitan condiciones ideales en cuanto a fuentes de nitrógeno, carbono, aerobiosis, pH, temperatura, iones, entre otros (Hasani, Kariminik, & Issazadeh, 2014). Evangelista-Martínez & Moreno-Enríquez (2007) discuten que los aislamientos sometidos a estrés son capaces de alcanzar una mayor tasa de producción de compuesto antibióticos, sin embargo, los resultados de esta investigación sugieren que los aislamientos sometidos a bajo nivel de estrés podrían generar un mayor grado de inhibición debido a que respeta las condiciones ideales para la producción de antimicrobianos como lo menciona Uzcategui-Negrón, Serrano, & Panizo (2013).

El mejor solvente fue acetonitrilo, lo cual sugiere que la mayoría de los componentes antibióticos son de alta polaridad, por ejemplo Ilic et al. (2007) encontró que el mejor solvente fue *n*-butanol, el cual a pesar de ser un alcohol está catalogado como de baja polaridad por su cadena de carbonos. A pesar de que ninguno de los extractos se asemejó al control, se debe tomar en cuenta que es necesario probar otros métodos de extracción como cromatografía o buscar extracción de metabolitos en solventes poco polares como etil acetato, acetona, cloroformo, tolueno, ciclohexano y/o hexano (solventes con polaridad descendiente) los cuales podrían generar extractos con mejores resultados a los obtenidos en este trabajo (Bacon et al., 2017). El DMSO es utilizado principalmente para la dilución de componentes por su alta polaridad (Bacon et al., 2017) y el metanol el cual también es muy polar pero no lograron extraer metabolitos por lo que concluye que las dificultades se presentaron en la extracción, ya sea por los métodos elegido o el agua que se extrajo del agar diluyó la mezcla e imposibilitó la extracción.

6. Conclusiones

1. La mayoría de los ocho aislamientos promisorios elegidos a partir de la prueba de sensibilidad, mostraron actividad inhibitoria contra *Staphylococcus aureus*, sin

embargo, la S9 y S19 lograron inhibir también a *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, lo cual tiene importancia clínica debido al potencial peligro de *K. pneumoniae* y su resistencia antibiótica emergente.

2. A partir de los ensayos del presente proyecto de graduación se logró comenzar una colección de aislamientos de *Streptomyces* spp. en el laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional e identificar dos con potencial uso biomédico.
3. Con el presente proyecto de graduación se demostró la importancia de la investigación biomédica y las oportunidades de desarrollo que se pueden explorar dentro de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional.
4. Los suelos cercanos al río Pirro dentro de la Universidad Nacional son potencial fuente de microorganismos con capacidad antimicrobiana para aplicaciones biotecnológicas.
5. Los métodos de raya y de tapete exhibieron resultados similares, sin embargo, el método de tapete alcanzó un mejor nivel de inhibición en los tratamientos en relación con el método de raya.
6. El solvente con los mejores resultados para la extracción de sustancias antimicrobianas provenientes de los aislamientos de actinomicetos con morfotipos del género *Streptomyces* spp. fue el acetonitrilo.

7. Recomendaciones

1. Evaluar un mayor número de solventes para la extracción y diferentes caldos de fermentación que incluyan carbonato de calcio como el caldo de levadura y caldo extracto malta-dextrosa.
2. Fraccionar los extractos derivados de los aislamientos de actinomicetos mediante métodos cromatográficos como HPLC para recuperar compuestos antimicrobianos con mayor grado de pureza.
3. Concentrar y conservar a un plazo mayor las fracciones antimicrobianas que se extraen de las bacterias, por ejemplo, procesos de centrifugación, resuspensión y liofilización.

4. Determinar la concentración mínima inhibitoria con las fracciones para obtener datos cuantitativos que sea de utilidad para dilucidar con mayor robustez la efectividad de aislamientos de actinomicetos.
5. Caracterizar las cepas que dieron mejores resultados mediante secuenciación genómica y aplicar un método de anotación para identificar los genes asociados a la actividad antimicrobiana.
6. Robustecer la colección de actinomicetos obtenidos en la presente tesis con otros microorganismos aislados de otras fuentes como cuerpos de agua.

8. Referencias

- Anunciação, J., Sousa, D. J., & Olivares, F. L. (2016). Plant growth promotion by streptomycetes : ecophysiology , mechanisms and applications. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 3(24), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0073-5>
- Atta, H. M., El-Sayed, A. S., El-Desoukey, M. A., Hassan, M., & El-Gazar, M. (2012). Biochemical studies on the Natamycin antibiotic produced by *Streptomyces lydicus*: Fermentation, extraction and biological activities. *Journal of Saudi Chemical Society*, 19(4), 360–371. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2012.04.001>
- Bacon, K., Boyer, R., Denbow, C., O’Keefe, S., Neilson, A., & Williams, R. (2017). Evaluation of different solvents to extract antibacterial compounds from jalapeño peppers. *Food Science and Nutrition*, 5(3), 497–503. <https://doi.org/10.1002/fsn3.423>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Becton, D. Company (2017). BBL CHROMagar Candida Médium. Instrucciones de uso-medios en placa listos para usar. PA-254032.08.
- Béhal, V. (2002). Antibiotics. *Biotechnology Annual Review*. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(02\)08010-9](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(02)08010-9)
- Belloso, W. H. (2009). Historia de los antibióticos. *Revista Hospital Italiano de Buenos Aires*, 29(2), 102–111.
- Berendonk, T. U., Manaia, C. M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., ... Martinez, J. L. (2015). Tackling antibiotic resistance: The environmental framework. *Nature Reviews Microbiology*, 13(5), 310–317. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3439>
- Bizuye, A., Moges, F., & Andualem, B. (2013). Isolation and screening of antibiotic producing actinomycetes from soils in Gondar town, North West Ethiopia. *Asian*

Pacific Journal of Tropical Disease, 3(5), 375–381. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(13\)60087-0](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(13)60087-0)

- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969–976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
- Cordovez, V., Carrion, V. J., Etalo, D. W., Mumm, R., & Zhu, H. (2015). Diversity and functions of volatile organic compounds produced by *Streptomyces* from a disease-suppressive soil, 6(October), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01081>
- Dahm, H., & Golinska, P. (2013). Antagonistic properties of *Streptomyces* isolated from forest soils against fungal pathogens of pine seedlings. *Dendrobiology*, 69, 87–97.
- Das, S., Ward, L. R., & Burke, C. (2010). Screening of marine *Streptomyces* spp. for potential use as probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 305(1–4), 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.04.001>
- de Lima Procópio, R. E., da Silva, I. R., Martins, M. K., de Azevedo, J. L., & de Araújo, J. M. (2012a). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16(5), 466–471. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.014>
- Dodds, D. R. (2016). Antibiotic Resistance; a Current Epilogue. *Biochemical Pharmacology*, 134(December), 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.12.005>
- Duncan, K., Haltli, B., Gill, K. A., & Kerr, R. G. (2014). Bioprospecting from marine sediments of New Brunswick, Canada: Exploring the relationship between total bacterial diversity and actinobacteria diversity. *Marine Drugs*, 12(2), 899–925. <https://doi.org/10.3390/md12020899>
- Dwyer-lindgren, L., Bertozzi-villa, A., Stubbs, R. W., Morozoff, C., Shirude, S., Naghavi, M., ... Murray, C. J. L. (2017). Trends and Patterns of Differences in Chronic Respiratory Disease Mortality Among US Counties, 1980-2014, 98121(12), 1136–1149. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.11747>
- Evangelista-Martínez, Z., & Moreno-Enríquez, A. (2016). Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos. *Revista BioTecnología*, 11(January 2007), 37–50.
- Fguira, L. F., Fotso, S., Ben Ameer-Mehdi, R., Mellouli, L., & Laatsch, H. (2005). Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. *Research in Microbiology*, 156, 341–347. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.10.006>
- Fica, A. (2014). Resistencia antibiótica en bacilos gram negativos, cocáceas gram positivas y anaerobios. implicancias terapéuticas. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(3), 432–444. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(14\)70060-4](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(14)70060-4)

- Fischbach, M. A., & Walsh, C. T. (2009). Antibiotics for emerging pathogens. *Science*, 325(5944), 1089–1093. <https://doi.org/10.1126/science.1176667>
- Hasani, A., Kariminik, A., & Issazadeh, K. (2014). Streptomycetes : Characteristics and Their Antimicrobial Activities, 2(1), 63–75.
- Higginbotham, S. J., & D. Murphy, C. (2010). Identification and characterisation of a *Streptomyces* sp . isolate exhibiting activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiological Research*, 165(1), 82–86. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2008.12.004>
- HIMEDIA, “M2 Agar,” M858 datasheet, [Revisión Feb. 2015]
- Ibnsouda, S. K., Balouri, M., Bouhdid, S., Harki, E. H., Sadiki, M., & Ouedrhiri, W. (2015). Antifungal Activity of *Bacillus* Spp . Isolated From *Calotropis Procera* Ait . Rhizosphere Against *Candida Albicans*. *Asian J Ournal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 8(2), 0–4.
- Ilic, S. B., Konstantinovic, S. S., Todorovic, Z. B., Lazic, M. L., Veljkovic, V. B., Jokovic, N., & Radovanovic, B. C. (2007). Characterization and Antimicrobial Activity of the Bioactive Metabolites in *Streptomyces* Isolates, 76(4), 480–487. <https://doi.org/10.1134/S0026261707040066>
- Jin, C. Y., Jun, H. K., Jung, W. H., Nae, S. P., Jae, K. S., June, W. L., ... Chi, N. S. (2007). Production and biological activity of laidlomycin, anti-MRSA/VRE antibiotic from *Streptomyces* sp. CS684. *Journal of Microbiology*, 45(1), 6–10.
- Kharel, M. K., Shepherd, M. D., Nybo, S. E., Smith, M. L., Bosserman, M. A., & Rohr, J. (2010). Isolation of *Streptomyces* species from soil. *Current Protocols in Microbiology*, 1–5. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc10e04s19>
- Leon, J., Aponte, J. J., Rojas, R., Cuadra, D., Ayala, N., Tomás, G., & Guerrero, M. (2011). Estudio de actinomicetos marinos aislados de la costa central del Perú y su actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* metilicina resistente y *Enterococcus faecalis* vancomicina resistente, 28(2), 4–5.
- Lemus Angulo, J. A. (2019). Multiplicación de *Streptomyces* sp. con propósitos de biocompostaje de subproductos de caña de azúcar.
- Li, J., Zhao, G. Z., Chen, H. H., Wang, H. B., Qin, S., Zhu, W. Y., ... Li, W. J. (2008). Antitumour and antimicrobial activities of endophytic streptomycetes from pharmaceutical plants in rainforest. *Letters in Applied Microbiology*, 47(6), 574–580. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02470.x>
- MacGowan, A., & Macnaughton, E. (2017). Antibiotic resistance. *Medicine*, 45(10), 622–628. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.07.006>
- Macgregor, W. S. (1962). The Chemical And Physical Properties of DMSO. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*
- Malone, K. M., & Gordon, S. V. (2016). Antibiotic Methylation : A New Mechanism of Antimicrobial Resistance. *Trends in Microbiology*, 24(10), 771–772.

<https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.08.003>

- Mason, C. J., Zeldin, E. L., Currie, C. R., Raffa, K. F., & Mccown, B. H. (2014). Populations of uncultivated American cranberry in sphagnum bog communities harbor novel assemblages of Actinobacteria with antifungal properties. *NRC Research Press*, 595(May), 589–595.
- Monge, K. M. M. (2013). Terapéutica Médica Carbapenémicos : Tipos Y Mecanismos De Resistencia. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamerica*, (608), 599–605.
- Narancic, T., Djokic, L., Kenny, S. T., Connor, K. E. O., Radulovic, V., Nikodinovic-runic, J., & Vasiljevic, B. (2012). Metabolic versatility of Gram-positive microbial isolates from contaminated river sediments. *Journal of Hazardous Materials*, 215–216, 243–251. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.02.059>
- Nishat, S. A., & Alam, M. M. (2017). Screening of antibiotic-producing *Streptomyces* from marine sediments of Bangladesh. *A Journal of Bangabandhu Sheikh Mujib Medical University*, (10), 255:259. <https://doi.org/10.3329/bsmmuj.v10i4.34403>
- Park, H., Oh, C., Lee, H., Lee, J., Yang, K., & Bark, K. (2002). Spectroscopic Properties of Fluoroquinolone Antibiotics in Water – methanol and Water – acetonitrile Mixed Solvents ¶, 75(3), 237–248.
- Park, S. B., Lee, I. A., Suh, J. W., Kim, J. G., & Lee, C. H. (2011). Screening and identification of antimicrobial compounds from *Streptomyces bottropensis* suppressing rice bacterial blight. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(12), 1236–1242. <https://doi.org/10.4014/jmb.1106.06047>
- Parte, A.C. (2018). LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68, 1825-1829; doi: 10.1099/ijsem.0.002786
- Possiede, Y. M., Gos, F. M. W. R., Glienke, C., Rohr, J., Savi, D. C., Aluizio, R., ... Thorson, J. S. (2017). Antibacterial Activity of Endophytic Actinomycetes Isolated from the Medicinal Plant *Vochysia divergens* (Pantanal, Brazil). *Frontiers in Microbiology*, 8(September). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01642>
- Quintero, M., Velásquez, A., Jutinico, L. M., Jiménez-Vergara, E., Blandón, L. M., Martínez, K., ... Gómez-León, J. (2018). Bioprospecting from marine coastal sediments of Colombian Caribbean: screening and study of antimicrobial activity. *Journal of Applied Microbiology*, 125(3), 753–765. <https://doi.org/10.1111/jam.13926>
- Rashad, F. M., Fathy, H. M., El-Zayat, A. S., & Elghonaimy, A. M. (2015). Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematicidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt. *Microbiological Research*, 175, 34–47. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.03.002>
- Roose-Amsaleg, C., & Laverman, A. M. (2016). Do antibiotics have environmental side-effects? Impact of synthetic antibiotics on biogeochemical processes. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(5), 4000–4012. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4943-3>

- Sanches Henao, C. P., Gomez Grimaldos, N. A., & Quintero Diaz, J. C. (2012). Producción de ácido clavulánico por fermentación de *Streptomyces clavuligerus*: Evaluación de diferentes medios de modelado y cultivo matemático. *Dyna*, 79(175), 158–165.
- Sharma, V. K., Johnson, N., Cizmas, L., McDonald, T. J., & Kim, H. (2016). A review of the influence of treatment strategies on antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. *Chemosphere*, 150, 702–714.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.12.084>
- Shirling, E. B., & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterizations of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16(3), 313–340.
- Su, M., Satola, S. W., & Read, D. (2019). Genome-Based Prediction of Bacterial Antibiotic Resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(3), 1–15.
- Suárez-Moreno, Z. R., Vinchira-Villarraga, D. M., Vergara-Morales, D. I., Castellanos, L., Ramos, F. A., Guarnaccia, C., ... Moreno-Sarmiento, N. (2019). Plant-growth promotion and biocontrol properties of three *Streptomyces* spp. isolates to control bacterial rice pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 10(FEB), 1–17.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00290>
- Sutton, S. (2011). Measurement of Microbial Cells by Optical Density. *Microbiology Topics*, 46–49.
- Tan, Z., Shi, Y., Xing, B., Hou, Y., Cui, J., & Jia, S. (2019). The antimicrobial effects and mechanism of ϵ -poly-L-lysine against *Staphylococcus aureus*. *Bioresources and Bioprocessing*, (29). <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0246-8>
- Terra, L., Dyson, P. J., Hitchings, M. D., Thomas, L., Abdelhameed, A., Banat, I. M., ... Quinn, G. A. (2018). A novel alkaliphilic streptomyces inhibits ESKAPE pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 9(OCT), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02458>
- Ubillus, J. A., Quispe, J. L., Durán, R. R., Trujillo, S. M., & Salazar, L. L. (2015). Artículo original Actividad antimicrobiana y sinérgica de metabolitos producidos por, 35(13–19), 13–19.
- Uzcategui-Negrón, M. del C., Serrano, J. A., & Panizo, M. M. (2013). Condiciones de cultivo que fomentan la producción de sustancias antimicrobianas en actinomicetos patógenos y del suelo. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 33(2), 134–139. Retrieved from
http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562013000200009
- Vargas, M. R., Castro, L. P., Chacón, R. V, Monge, R. M., & Obando, F. N. (2011). Evaluación Ecológica Rápida de un Ecosistema Urbano: El Caso de la Microcuenca del Río Pirro, Heredia, Costa Rica. *Revista Geográfica de América Central*, (47), 41–70.
- Vergara Quintero, M. del C. (2007). Tres concepciones históricas del proceso de salud-enfermedad. *Revista Hacia La Promoción de La Salud*, 12, 41–50.
- Yu, J., Liu, Q., Liu, Q., Liu, X., Sun, Q., Yan, J., ... Fan, S. (2008). Effect of liquid culture

requirements on antifungal antibiotic production by *Streptomyces rimosus* MY02.
Bioresource Technology, 99(6), 2087–2091.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.03.023>

Zaffiri, L., Gardner, J., & Toledo-Pereyra, L. H. (2012). History of Antibiotics . From Salvarsan to Cephalosporins. *Journal of Investigative Surgery*, 25, 67–77.
<https://doi.org/10.3109/08941939.2012.664099>