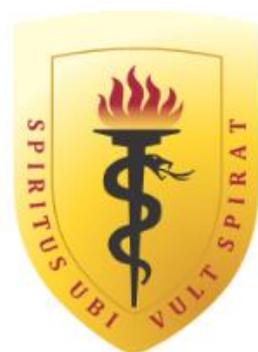


UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFIA

“ALBERTO CAZORLA TALLERI”



**EVALUACION DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE
STREPTOMYCES SP. 6E3 AISLADO DE MINERALES
FRENTE A *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METICILINO
RESISTENTE**

Angela Luisa Ampuero León

Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico

Lima – Perú

2016

A Ana y Arturo, mis padres, por su cariño, apoyo incondicional y por todo lo que me han enseñado de la vida.

A André, mi hermano, y Avelina, mi abuela, por su paciencia, buen humor y rica comida.

A Doggie y Mathias, los hermosos de cuatro patas.

AGRADECIMIENTOS

“Cada amigo significa un mundo entero en nosotros, un mundo que probablemente permanece unánime mientras no aparecen nuestros amigos. Pero con tan solo este encuentro puede empezar toda una vida” - Anaïs Nin

Este trabajo no hubiese sido posible de no haber contado con el apoyo de quienes considero son un gran equipo:

A mi asesora, la **Dra. Jasmin Hurtado**, por confiar en mí para este trabajo, por su enseñanza, paciencia, consejos y apoyo durante todo este tiempo.

A la **Dra. Rosario Rojas**, por su apoyo durante el trabajo y por haberme permitido ser parte de su equipo por un breve tiempo, en el que aprendí mucho.

A **Candy Ruiz**, por su apoyo aun en los momentos más tediosos del trabajo, por su paciencia y por haberme enseñado más del mundo químico.

A la **MSc. Dora Maurtua**, por haberme abierto las puertas a la microbiología, por su confianza, su cariño y su amistad.

A **Ruth Cristóbal y YuriPuicon**, por haberme enseñado muchas cosas de la microbiología y la vida, por su amistad, por su apoyo incondicional y por todo lo que hemos pasado juntas.

A **Omhar Chavez**, por ser un excelente amigo, por las risas y por la eterna micropipeta que pedía prestada para continuar mi trabajo.

Al **SrDavid Poma y la Sra. Reyda Terrones**, gracias por decirme siempre que continuara, por su gran ayuda durante mi trabajo, gracias por las risas de todos los días y gracias por todas las historias y experiencias que han compartido conmigo.

A **Betsabé y Saraliz**, por las risas compartidas aun en los momentos de estrés y por su amistad.

A mis tíos **Adriana y Alci**, por el apoyo incondicional desde el inicio de mi carrera.

A **Rosa Calderón**, porque aun a la distancia me has apoyado, por la confianza que has depositado en mí, por las risas y todo lo compartido pero principalmente por ser mi gran amiga.

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1.- Cuadro de observaciones macroscópicas y microscópicas de la cepa <i>Streptomyces sp.</i> 6E3..... | 21 |
| Tabla 2.- Actividad antibacteriana de cepa <i>Streptomyces sp.</i> 6E3 por método de doble capa. (A) Valores de los experimentos y (B) promedios..... | 22 |
| Tabla 3.- Actividad del extracto bruto de la cepa 6E3 por método de disco difusión..... | 24 |
| Tabla 4.- Valor de R _f 's obtenidas de las fracciones..... | 27 |
| Tabla 5.- Actividad antimicrobiana de las fracciones por método de disco difusión..... | 27 |
| Tabla 6.- Mínima Concentración Inhibitoria de las fracciones..... | 28 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1.- Número aproximado de compuestos de acuerdo a su fuente natural de origen..... | 5 |
| Figura 2.- Distribución de los antibióticos descubiertos de acuerdo a su origen microbiológico..... | 7 |
| Figura 3.- Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i> en medio sólido y medio líquido..... | 9 |
| Figura 4.- Observación macroscópica de la cepa <i>Streptomyces sp.</i> 6E3..... | 20 |
| Figura 5.- Tinción Gram a la cepa de <i>Streptomyces sp.</i> 6E3..... | 21 |
| Figura 6.- Determinación de actividad antimicrobiana por método de Doble Capa. Enfrentamiento contra (A) <i>S. aureus</i> ATCC 43300, (B) <i>S. aureus</i> ATCC 33862 y (C) <i>S. aureus</i> cepa clínica (metecilino resistente)..... | 23 |
| Figura 7. Cromatografía del extracto bruto..... | 24 |
| Figura 8. Observación de las fracciones en placas cromatográficas bajo lámpara UV a longitud de onda de 366 nm y 265 nm..... | 26 |
| Figura 9. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de las fracciones frente a <i>S. aureus</i> ATCC 43300 Metecilino-resistente. Fotografía (A), Esquema de diluciones en ug/l (B) y Curva del efecto de la fracción D (C)..... | 28 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------|---|
| d.C. : | Después de Cristo |
| MRSA: | MeticilinResistant <i>Staphylococcus aureus</i> |
| OMS: | Organización Mundial de la Salud |
| CDC: | Centro para el Control y Prevención de Enfermedades |
| INS: | Instituto Nacional de Salud |
| PCD: | ProgramedCellDeath |
| VREF: | Vacomycin Resistan t <i>Enterococcus faecalis</i> |
| CMI: | Concentración Mínima Inhibi toria |
| SPE: | Solid PhaseExtraction |
| ATCC: | American Type Culture Collection |
| nm: | nanómetr os |
| ICBM: | Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Sao Paulo |
| rpm: | revoluciones por minuto |
| TLC: | Thin Layer Chromatography |
| UV: | ultravioleta |
| DMSO: | dimetilsulfóxido |
| TTC: | 2,3,5- trifeniltetrazolio cloruro |
| Rf: | relación de frentes |

RESUMEN

Dentro de los productores de antimicrobianos, las bacterias del genero *Streptomyces* son las que tienen el mayor potencial para la síntesis de dichas sustancias. Estas bacterias gram positivas y filamentosas son las responsables del descubrimiento de la mayor cantidad de compuesto activos que son de origen microbiológico.

Debido a la importancia de estos microorganismos, el presente trabajo tiene como objetivos demostrar la actividad antibacteriana de la cepa *Streptomyces sp.* 6E3, producir un extracto, determinar el número de compuesto que tiene, realizar un fraccionamiento y la CMI de cada una de dichas fracciones.

El screening para determinar la actividad antimicrobiana de la cepa fue realizado por el método de Doble Capa o Agar Overlay, el cual demostró que la cepa era activa frente a las cepas de *S. aureus* ATCC 33862, *S. aureus* ATCC 43300 metilino resistente y *S. aureus* metilino resistente de origen clínico.

El extracto fue directamente obtenido de las células de la bacteria, crecidas en un medio solido con lo cual se obtuvo una cantidad de 141.9mg de extracto. Para conocer el número de compuestos, se realizó una Thin Layer Chromatography (TLC) con lo que se pudo observar que en el extracto obtenido estaban presentes seis compuestos.

El extracto fue fraccionado por medio de una SPE de fase reversa, con lo que se obtuvo seis fracciones de las cuales solo cinco de ellas eran activas frente a las cepas de *S. aureus* mencionadas. La CMI realizada por el método de microdilucion, demostró que la fracción D tenia mayor actividad frente a las cepas de *S. aureus* ATCC 33862, *S. aureus* ATCC 4300 metilino resistente y *S. aureus* metilino resistente de origen clínico con CMI's de 0.88 ug/ml, 0.44 ug/ml y 1.76 ug/ml respectivamente.

ABSTRACT

Within the antimicrobial producers, bacteria of genus *Streptomyces* are the most potential for the synthesis of those substances. These gram-positive and filamentous bacteria are responsible for the discover of the highest amount of active compounds from microbiological origin.

Due to the importance of this microorganism, the present work has the purpose of demonstrate the antibacterial activity of *Streptomyces* spp. 6E3 strain, produce an extract, know the amount of compounds in the extract, realize a fractionation and the MIC to every fraction obtained.

The screening to determinate the antibacterial activity of the strain was made through the Agar Overlay method, which showed that the strain was active against *S. aureus* ATCC 33862, *S. aureus* ATCC 43300 methicillinresistant and *S. aureus* methicillin resistant wild type.

The extract was obtained directly of the bacterial cells, grown in solid media from which was obtained 141.9mg of extract. To know the number of compounds, a Thin Layer Chromatography (TLC) was performed and it was determinate that the extract had six compounds.

The extract was fractioned through SPE of reverse phase, and it was determinate that five of six fractions were active against *S. aureus* strains, mentioned before. The MIC was determinate by the method of microdilution, which showed that the D fraction has the major activity against *S. aureus* ATCC 33862, *S. aureus* ATCC 43300 methicillin resistant and *S. aureus* methicillin resistant wild type with MIC's of 0.88 ug/ml, 0.44 ug/ml and 1.76 ug/ml respectively

INDICE

| | |
|--|-----------|
| I. Introducción..... | 3 |
| 1.1 Definición de antibióticos, biocidas y antimicrobianos..... | 4 |
| 1.2 Producción de antimicrobianos e importancia en la industria..... | 5 |
| 1.2.1 Los Actinomicetos..... | 6 |
| 1.2.2 Genero <i>Streptomyces</i> | 7 |
| 1.2.2.1 Clasificación Taxonómica..... | 7 |
| 1.2.2.2 Características del Género..... | 8 |
| 1.2.3. Actividad Antimicrobiana: Antecedentes..... | 10 |
| II. Objetivos..... | 12 |
| 2.1. Objetivos generales..... | 12 |
| 2.2. Objetivos Específicos..... | 12 |
| III. Metodología..... | 13 |
| 3.1 Cepas..... | 13 |
| 3.2. Equipos..... | 13 |
| 3.3. Medios de Cultivo..... | 13 |
| 3.4 Detección de la Fase de Producción de metabolitos antibacterianos..... | 14 |
| 3.5 Determinación de actividad antimicrobiana..... | 14 |
| 3.5.1 Método de Doble Capa para el screening de la cepa..... | 14 |
| 3.5.2 Determinación de actividad antibacteriana del extracto y sus fracciones mediante método de disco-difusión o Kirby-Bauer..... | 15 |
| 3.6 Obtención de extracto de <i>Streptomyces</i> sp 6E3..... | 15 |

| | |
|---|-----------|
| 3.6.1 Preparación de la cepa..... | 15 |
| 3.6.2 Preparación del extracto..... | 16 |
| 3.7 Fraccionamiento del extracto medio de extracción de fase solida (SPE) en columna..... | 17 |
| 3.8. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)..... | 17 |
| 3.8.1 Preparación de las diluciones de los extractos y de los antibióticos estándar..... | 17 |
| 3.8.2 Método de Microdilucion en caldo..... | 18 |
| IV. Resultados..... | 20 |
| 4.1. Determinación de la Fase de Producción..... | 20 |
| 4.2 Determinación de la actividad antibacteriana de la cepa <i>Streptomyces sp</i> 6E3 por método de Doble Capa..... | 22 |
| 4.3 Obtención de Extracto, comprobación de actividad antibacteriana y cromatografía de capa fina para observación del número de compuestos..... | 23 |
| 4.4 Fraccionamiento del extracto..... | 25 |
| 4.5 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las fracciones por el método de microdilucion..... | 28 |
| V. Discusión..... | 30 |
| VI. Conclusiones..... | 34 |
| VII. Recomendaciones..... | 35 |
| VIII. Referencias bibliográficas..... | 36 |
| IX. Anexos..... | 43 |

I. INTRODUCCION

El ser humano siempre ha estado en búsqueda del desarrollo y descubrimiento de sustancias que ayuden a combatir a los microorganismos y los efectos graves que estos ocasionan.

De los primeros métodos usados para combatir a estos gérmenes, se encuentra registrado el uso de hongos, plantas y tierra. En el antiguo Egipto, se empleaban trozos de pan con moho o un revestimiento de miel sobre las heridas infectadas, siendo este último el más empleado porque la miel es higroscópica e impide que se peguen los microorganismos(1).

Se han encontrado rastros de antimicrobianos como tetraciclina, en restos óseos humanos provenientes de Nubia que datan entre el 350 – 550 d.C. (2), existiendo muchas hipótesis sobre la procedencia de dicha molécula quelante.

En la medicina china tradicional se ha registrado el descubrimiento y uso de diferentes hierbas con actividad antimicrobiana, siendo muchas de ellas estudiadas actualmente con el fin de identificar los componentes bioactivos (3).

En 1939 se inicia el uso del primer antibiótico descubierto: la penicilina(4), permitiendo el tratamiento de enfermedades infecciosas en su mayoría causadas por bacterias e iniciando con ello el *boom* de los antibióticos. Como resultado, se logró mejorar la calidad y el tiempo de vida de las personas, tanto así que se creyó ganada la batalla contra las enfermedades bacterianas.

Al término de la década de los 60, se dio un decline en el descubrimiento de nuevos fármacos por parte de las industrias farmacéuticas (5). Años posteriores, se da inicio a una etapa en donde el rebrote de enfermedades infecciosas tanto de origen bacteriano como viral resquebrajan el optimismo de la gente frente a las enfermedades infecciosas. Empiezan a aparecer enfermedades como el cólera, el SIDA, la fiebre tifoidea y otras conocidas pero causadas por bacterias con resistencia antibiótica (6).

Durante los últimos años, las bacterias con resistencia antibiótica han ido apareciendo con mayor frecuencia e incluso se está empezando a considerar como parte de una pandemia. En el 2008, la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas lanzó un

comunicado, mencionando que se estaría iniciando una epidemia de este tipo de microorganismos, resaltando a *Staphylococcus aureus* resistentes a Meticilina (MRSA), *Mycobacterium tuberculosis* e inclusive a los bacilos gram negativos (7) como las Enterobacterias. Entre el 2014 y el presente año, tanto la Organización Mundial de la Salud (OMS)(8) como el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) (9) han iniciado programas para monitorear y prevenir una mayor expansión de estos microorganismos resistentes. En Perú, el Instituto Nacional de Salud (INS) realiza monitoreos y junto con el Ministerio de Salud, ejecutan en la actualidad programas de prevención para mejorar el uso de los antibióticos.

Todo esto, ha motivado que muchas instituciones internacionales y muchos otros científicos se unan en la búsqueda de nuevos antibióticos que puedan combatir las enfermedades infecciosas y a las cepas resistentes.

1.1 Definición de antibióticos, biocidas, antimicrobianos

Los antimicrobianos son las sustancias quimioterapéuticas conocidas desde anterioridad a su época de apogeo que inició en la década de 1940. Dentro de la descripción de los antimicrobianos se encuentra que son sustancias químicas naturales o sintéticas y tienen el fin de eliminar o inhibir el crecimiento bacteriano(4), generalmente son provenientes de hongos, bacterias (Figura 1) así como de plantas y otras fuentes naturales. También, se les denomina como “antibióticos”, término que fue usado primero por el investigador Selman Waksman, pero con referencia a que estas sustancias antagonizaban el crecimiento microbiano (10, 11). En algunos textos, se le encuentra también como “biocidas”, término que define a una sustancia natural o sintética capaz de matar microorganismos (12).

| Source | All known compounds | "Bioactives" | Antibiotics |
|---|---------------------|------------------|----------------|
| Natural Products | over one million | 200000 to 250000 | 25000 to 30000 |
| Plant Kingdom | 600000 to 700000 | 150000 to 200000 | ~25000 |
| Microbes | over 50000 | 22000 to 23000 | ~17000 |
| Algae, Lichens | 3000 to 5000 | 1500 to 2000 | ~1000 |
| Higher Plants | 500000 to 600000 | ~100000 | 10000 to 12000 |
| Animal Kingdom | 300000 to 400000 | 50000 to 100000 | ~5000 |
| Protozoa | several hundreds | 100 to 200 | ~50 |
| Invertebrates: | ~100000 | ? | ~500 |
| Marine animals | 20000 to 25000 | 7000 to 8000 | 3000 to 4000 |
| Insects/worms/etc. | 8000 to 10000 | 800 to 1000 | 150 to 200 |
| Vertebrates (mammals, fishes, amphibians, etc.) | 200000 to 250000 | 50000 to 70000 | ~1000 |

Figura 1. Número aproximado de compuestos de acuerdo a su fuente natural de origen, (Berdy, 2014)(13)

1.2. Producción de antimicrobianos e importancia en la industria

Los antimicrobianos son parte del metabolismo secundario de muchos microorganismos, produciéndose generalmente durante la fase tardía del crecimiento microbiano o también llamada idiofase (12, 14). Las vías metabólicas para la producción de estos compuestos son múltiples de acuerdo al tipo de sustancia que se sintetizará y estarían siendo controlados por *clusters* de genes (15), que varían según el microorganismo. La razón para la síntesis de los antimicrobianos es incierta, postulándose diversas teorías entre las que se menciona la competencia entre especies, pero se discrepa porque la producción se da al final de la curva de crecimiento y los productores no serían capaces de usar dichos metabolitos(16). Otra hipótesis, menciona que estas sustancias son “recortes” del metabolismo microbiano o parte del desecho metabólico (17), siendo lo último, no considerado en su totalidad debido a que si fuesen parte del desecho metabólico, deberían estar presentes en muchos otros microorganismos por ser parte común de una vía metabólica. Se ha propuesto, asimismo, que los antibióticos son producidos a la par que las esporas (considerado para aquella mayoría de microorganismos que producen dichas estructuras) pero no es considerado muy factible porque no siempre el desarrollo de esporas desencadena la producción de dichas sustancias (18). Se sugiere que otro motivo para la producción de estas mismas sería que los microorganismos realizan predación, es decir que empiezan a producir antimicrobianos cuando se le está acabando los sustratos que favorecen su crecimiento, usando a dichos compuestos para eliminar otros microorganismos en su medio y alimentarse de ellos, lo cual ha sido observado en especies de bacterias del

género *Streptomyces* (16) así como de *Myxobacterias* (19), lo que da mayor soporte a esta hipótesis.

Aunque a ciencia cierta, no se conoce exactamente el motivo por el cual se producen estos compuestos bioactivos, a lo largo de los años y posteriores al descubrimiento de la penicilina, las grandes empresas farmacéuticas iniciaron el proceso de descubrimiento, desarrollo y venta de antimicrobianos, caracterizándose este periodo por encontrar de manera “*random*” a dichas sustancias (20). Los principales antibióticos que causaron un gran apogeo, tanto para la industria como para la sociedad, fueron las penicilinas y sus derivados, la estreptomina que fue la primera droga para combatir la tuberculosis y las cefalosporinas y sus derivados semisintéticos(21), producidos por hongos y bacterias. Actualmente, las empresas e instituciones de investigación están tomando muy en cuenta a los microorganismos como productores de antimicrobianos, por lo que se está realizando estudios con el fin de encontrar nuevos microorganismos con la capacidad de producir estos compuestos y que a su vez sean eficaces frente a cepas con droga y multidrogoresistencia.

Dentro de los grupos de interés científico e industrial de productores de antimicrobiano, hay uno que ha demostrado ser el mayor productor de una gran variedad de dichas sustancias, los cuales son los actinomicetos.

1.2.1. Los Actinomicetos

Los actinomicetos son bacterias filamentosas Gram positivas que se caracterizan por un alto contenido de guanina (12) y citosina en su material genético, así como de tener un complejo ciclo de vida (22). En medios sólidos se desarrollan con morfologías similares a hongos por lo que, se creyó en un inicio que pertenecían a este grupo para luego demostrarse que estos eran afectados por ciertos antibióticos y bacteriófagos, además de presentar otras características del dominio Bacteria(23).

Estas bacterias se encuentran ampliamente distribuidas, tanto desde suelos hasta mares. Muchos de estos actinomicetos, en específico los que viven en tierra, producen un característico olor de “tierra mojada”, debido a la geosmina, una sustancia volátil que es uno de los tantos productos que originan dichas bacterias durante los procesos de biodegradación (22, 24). Además de esta sustancia, los

actinomicetos son conocidos por producir compuestos bioactivos, es decir, que tienen actividad sobre organismos biológicos sean o no beneficiosas. El número de compuestos bioactivos descubiertos en los actinomicetos llega a los 10100 compuestos, dentro de los cuales, unos 8700 compuestos son antibióticos (13); convirtiéndolos en los primeros productores de antibióticos a lo largo de los años.

Dentro de los actinomicetos, hay un género muy representativo, el cual es el mayor productor de antibióticos (Fig. 2) y actualmente con un fuerte potencial para el descubrimiento de otros compuestos bioactivos de alto requerimiento, este es el género *Streptomyces*.

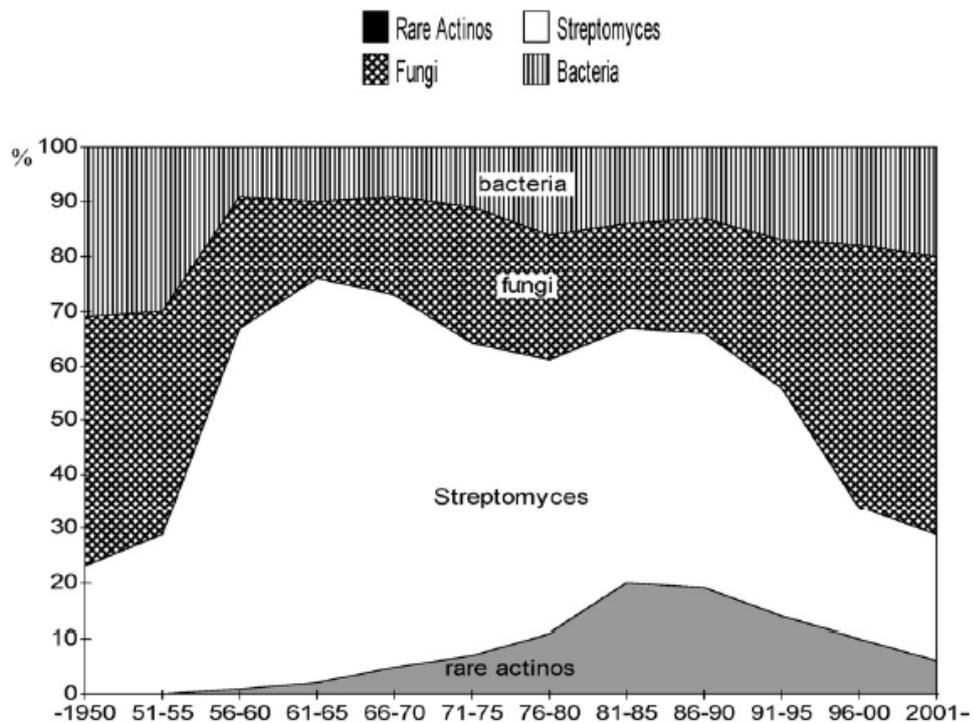


Figura 2. Distribución de los antibióticos descubiertos de acuerdo a su origen microbiológico (Berdy, 2014)(13).

1.2.2. Género *Streptomyces*

1.2.2.1. Clasificación Taxonómica

El género tiene la siguiente clasificación de acuerdo al Manual Bergey® de Bacteriología Sistemática(25):

- Dominio : Bacteria
- Phylum : Actinobacteria
- Clase : Actinobacteria
- Orden : Streptomycetales
- Familia : Streptomycetaceae
- Género : *Streptomyces*

1.2.2.2. Características del género

Los integrantes de este género son microorganismos aerobios que tiene un crecimiento ramificado y tienen micelio aéreo, producen una amplia variedad de pigmentos, además muchas de las cepas producen uno o más antimicrobianos (25).

Su ciclo de vida ha sido ampliamente estudiado, existiendo actualmente 2 modelos, el “clásico” y el “nuevo”. El modelo clásico, es el siguiente: A. Micelio vegetativo (multinucleado), B. Micelio aéreo, septación para formación de compartimentos uninucleados y cubierta hidrofóbica, C. Formación de esporas (25, 26). Este modelo clásico es aceptado para la vida del microorganismo *Streptomyces* en medio sólido (Fig. 3). En el modelo “nuevo” inicialmente se presenta un micelio segmentado (MI) que pasa por una muerte celular programada PCD (Programed Cell Death) para luego ser un micelio multinucleado (MII-A) y volver a pasar por una segunda PCD, siendo las células remanentes las que formen el micelio aéreo (MII-B) que posteriormente dará paso a la formación de esporas (Figura 3 - A)(26).

En medio líquido y de acuerdo al modelo clásico y nuevo, se dan todas las fases, a excepción de la esporulación (Figura 3 – B), lo que llevaría a decir que la

formación de esporas no es vital para la síntesis de los antibióticos, siendo esto confirmado en las industrias farmacéuticas, quienes utilizan bioreactores en los cuales el medio de crecimiento es líquido para la producción de dichos metabolitos. Por otro lado, dentro del crecimiento de cultivo en caldo de *Streptomyces*, se han visto cuatro submorfológicas: Pellets (masas compactas de casi 1mm de diámetro), Clumps (masas compactas de menos 1mm de diámetro), Hifas ramificadas e Hifas no ramificadas (27).

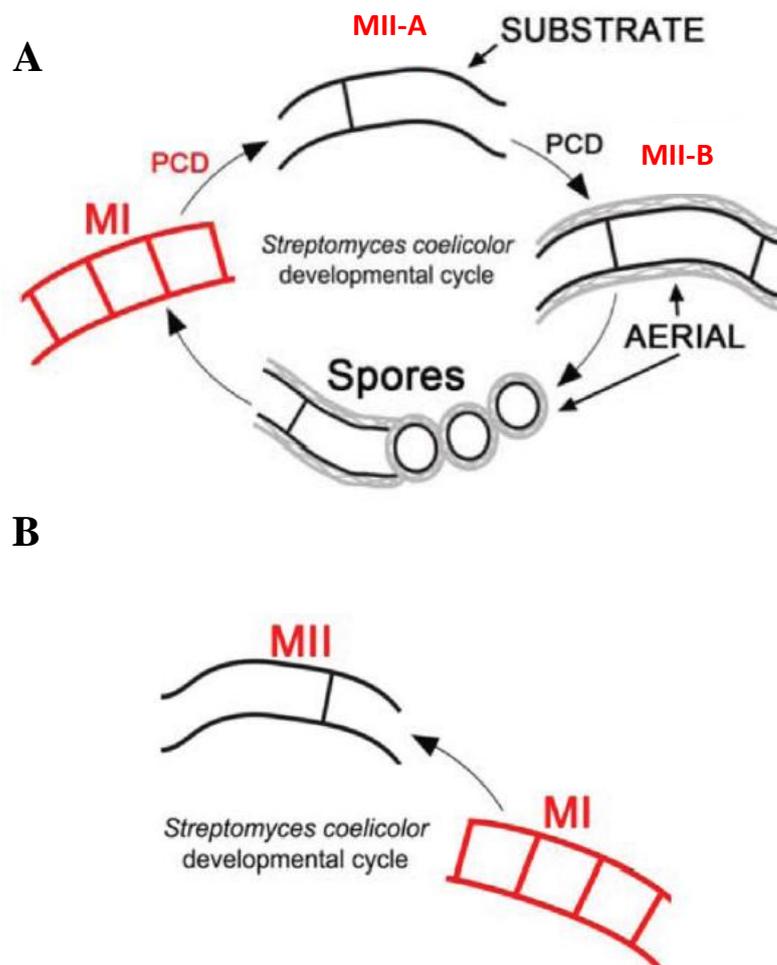


Figura 3. Ciclo de vida de *Streptomyces* en Medio Sólido (A) y Medio Líquido (B) (Manteca, 2010)(28).MI: Micelio vegetativo segmentado, MII: Segundo micelio multinucleado, vegetativo sin capa hidrofóbica (MII-A) y aéreo con capa hidrofóbica y segmentado (MII-B), PCD: Programmed Cell Death.

Se ha establecido, ya sea en medio sólido o líquido, que la fase en la que se da la síntesis de los metabolitos secundarios está directamente relacionada a la forma micelial aérea del microorganismo (29). Además, hay estudios que mencionan que la producción de dichos metabolitos en medio líquido, mejora cuando se han formado alguna de las subestructuras como pellets, tal es el caso de *S. olindensis* (30) o *S. coelicolor*, al cual se le ha realizado un estudio para la diferenciación de su morfología micelial y la relación con la producción de antibiótico (31). En otros se menciona que no hay relación alguna entre la submorfologías y la producción como es el caso de *S. virginiae* (32). Aunque se conoce la fase en la que el microorganismo produce metabolitos secundarios y esto es usado por las industrias para una producción masiva en bioreactores, no hay mucha información adicional que pueda mejorar la producción industrial(26).

1.2.3. Actividad antimicrobiana: Antecedentes

En 1943, los investigadores Selman Waksman y Albert Schatz quienes trabajaban en el aislamiento y screening de diferentes bacterias del suelo con el fin de encontrar antimicrobianos(33), reportaron y aislaron al primer aminoglucósido y medicamento contra la tuberculosis: estreptomicina (21, 33), producido por *Streptomyces griseus*. Este antibiótico, abriría paso a la búsqueda de más antimicrobianos contra la tuberculosis y posteriormente a una época en que la bacteria productora de la enfermedad obtendría múltiples resistencias.

Posterior a esto, se dio el descubrimiento de varios antimicrobianos a partir del género *Streptomyces*(34, 35), resaltando además del descubrimiento de la Estreptomicina, otros antibióticos como: vancomicina, un antibiótico que es vital para el tratamiento de *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente (MRSA por sus siglas en inglés), producido a partir de *Streptomyces orientalis*; el ácido clavulánico, producido por *Streptomyces clavuligerus*(36) que combinado con beta-lactámicos como penicilina, ayuda a que este llegue a su *target* en bacterias productoras de beta-lactamasa; el cloranfenicol, producido por *Streptomyces venezuelae*, que ayuda al tratamiento de tifoidea así como de meningitis (37). En la última década se descubrió y aprobó el uso de la daptomicina, el primer miembro de la familia de antibióticos conocida como lipopéptidos cíclicos, tiene

una gran actividad sobre bacterias Gram positivas como *S. aureus* y *Enterococcus spp.*(38, 39).

El espectro de actividad de muchos de los antimicrobianos producidos por especies del género *Streptomyces* abarca desde Gram positivos como negativos e incluso levaduras, pero varias especies tienen la tendencia a atacar principalmente a los Gram positivos como es el caso de la vancomicina, eritromicina y daptomicina.

En los últimos años y con el fin de encontrar nuevos metabolitos con actividad antimicrobiana a partir de estos microorganismos, los investigadores han empezado a realizar el aislamiento de estas bacterias a partir de diferentes muestras ya sean de suelo, mar, plantas (40-43) e inclusive en minerales (44). En muestras minerales, hay muchos estudios en donde se sabe que hay cepas del género *Streptomyces* que están presentes en estos medios con pocos nutrientes orgánicos (45-47) pero son escasos los que son utilizados para probar su actividad antimicrobiana, ya que más se busca la actividad biolixivante debido al medio de donde provienen.

En Perú también se está realizando la investigación con respecto a este género. Se han encontrado especies en ambientes marinos con actividad antibacteriana en cepas de *Staphylococcus aureus* Meticilino-resistente (MRSA) y *Enterococcus faecalis* Vancomicina-resistente (VREF) (48) e inclusive se ha encontrado una cepa capaz de actuar frente a cepas patógenas resistentes a beta-lactámicos (49).

Los resultados de las investigaciones que se están realizando, demuestran el gran potencial que guardan las especies y cepas del género *Streptomyces*, siendo una gran esperanza para combatir diversas enfermedades de origen microbiano.

Por estas razones, el presente trabajo tiene como fin demostrar la actividad antibacteriana de la cepa *Streptomyces sp.* 6E3 aislada de minerales frente a *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, por medio de un screening por el método de Agar-Overlay o Doble Capa, extraer y determinar el número de compuestos, fraccionar el extracto por medio de una SPE (Solid Phase Extraction) y determinar la actividad antibacteriana y la CMI.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Evaluar la actividad antimicrobiana de la cepa *Streptomyces sp.* 6E3 aislada de minerales frente a *S. aureus* meticilino resistente.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar la etapa de producción de metabolitos secundarios de la cepa *Streptomyces sp.* 6E3.
- Determinar la actividad antibacteriana de la cepa *Streptomyces sp.* 6E3 frente a cepas de *S. aureus* ATCC 33862, *S. aureus* ATCC 43300 y *S. aureus* meticilino resistente cepa clínica, por el método de Doble Capa.
- Producir un extracto de acetato de etilo a a partir de biomasa de la cepa *Streptomyces sp.* 6E3.
- Determinar la actividad antibacteriana por método de Kirby-Bauer del extracto de acetato de etilo de la cepa de *Streptomyces sp.* 6E3 sobre cepas de *S. aureus* ATCC 33862, *S. aureus* ATCC 43300 y *S. aureus* meticilino resistente cepa clínica
- Realizar un fraccionamiento del extracto de *Streptomyces sp.* 6E3 por SPE en columna.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las fracciones obtenidas sobre cepa (s) sensible(s).

III. METODOLOGIA

3.1. Cepas

La cepa de *Streptomyces sp.* 6E3, es una cepa que fue aislada a partir de minerales y que fue identificada fenotípicamente por el Laboratorio de Biotecnología Ambiental (Anexo 1).

Para las pruebas de actividad antimicrobiana, se utilizaron las cepas de *Staphylococcus aureus*. ATCC 33862, *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente ATCC 43300 y *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente de origen clínico proveniente del Instituto de Medicina Tropical “Alexander Von Humboldt”. (Anexos 2)

3.2. Equipos

Los equipos utilizados para este trabajo fueron los siguientes:

- a. *Estufas*: se utilizó para los siguientes propósitos
 - A 28°C para crecimiento de la cepa *Streptomyces* 6E3, tanto en caldo como en placa.
 - A 37°C para colocar las placas procesadas por el Método de Doble Capa (Procedimiento 3.5.1).
- b. *Vernier*: Se utilizó para medir los halo de inhibición del Método de Doble Capa (Procedimiento 3.5.1).
- c. *Sonicador con baño maría*: utilizado para realizar la lisis de las células de *Streptomyces spp.* 6E3 en el método de extracción (Procedimiento 3.5.2.).
- d. *Centrifuga*: Utilizado para el Procedimiento 3.5.2.
- e. *Rotavapor*: Para separación del solvente en el procedimiento 3.5.2.
- f. *Lámpara UV*: Para observación de placas cromatográficas en el método de extracción (Procedimiento 3.5.2) y fraccionamiento (Procedimiento 3.6).
- g. *Lector de ELISA*: para la lectura de las placas de 96 pozos en las que se realizó el procedimiento de Microdilución en caldo (Procedimiento 3.7.2)

3.3. Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron los siguientes:

a. *Medio Extracto de Levadura y Glicerina (XGAL)*: Tanto sólido (con agar) como líquido (caldo). El medio sólido se utilizó para la siembra de la cepa de *Streptomyces* en el método de “doble capa” (Método descrito en Procedimientos 3.5.1.) y la producción de biomasa de la cepa para el método de extracción. El medio líquido fue usado para la reactivación de la cepa y mantenimiento de la misma a 4°C.

b. *Agar Mueller Hinton (MHA)*: utilizado para el método de “doble capa” y los antibiogramas.

c. *Caldo Mueller Hinton (MHB)*: usado para la activación de cepas indicadoras con las que se realizaron los antibiogramas y el método de “doble capa”.

d. *Caldo Trypticasa de Soya (TSB)*: Usado para el mantenimiento de las cepas indicadoras a 4°C.

La composición de los medios se encuentra en la sección Anexos 3.

3.4. Detección de la fase de producción metabolitos antibacterianos

La fase de producción fue determinada por medio de la observación del microorganismo, la cual fue realizada microscópicamente a través de la coloración de Gram (procedimiento en Anexo 4) durante el crecimiento de la colonia, lo cual podía ir de 7 a 10 días. También se realizó una observación macroscópica con y sin estereoscopio.

3.5. Determinación de actividad antimicrobiana

3.5.1. Método de “doble capa”, para el screening de la cepa

Se utilizó el método de Doble Capa (50) modificado con las siguientes especificaciones. La cepa de *Streptomyces sp. 6E3* fue sembrada en caldo XGAL e incubada a 28°C por 7 a 10 días en microaerofilia, lo cual se realizó en una cámara de anaerobiosis y con la ayuda de una vela, lo cual permitió la disminución de oxígeno dentro del envase. Una vez obtenida la biomasa

requerida, se sembraron 40 uL del cultivo en el centro de la placa con agar XGAL. Las placas inoculadas fueron incubadas en microaerofilia a 28°C por 7 a 10 días o hasta observar la esporulación de la cepa y el cambio de color alrededor de la macrocolonia. Una vez observado, se agregaron 9mL de Agar Muller Hinton licuado previamente inoculado con cepas indicadoras mencionadas anteriormente en un volumen de 0.4mL a una longitud de onda de 620nm equivalente a la escala de 0.5 MacFarland. La placa con el medio solidificado, fue puesta a 37°C por 24 horas, después se midieron los halos correspondientes con ayuda de un vernier. Para tener otra referencia cualitativa, se midió también el diámetro de la colonia, para hallar el porcentaje de inhibición con la siguiente ecuación (48):

$$\% \text{ de inhibicion} = \frac{\text{diametro de la colonia}}{\text{diametro total}} \times 100$$

El método se realizó por duplicado frente a cada cepa patógena.

3.5.2. Determinación de actividad antibacteriana del extracto y sus fracciones mediante método de disco-difusión o Kirby-Bauer

Se usó el método de Kirby-Bauer o Disco Difusion(51), con las siguientes modificaciones: el medio usado para la prueba tanto a las bacterias como a la levadura fue de Mueller-Hinton Agar (MHA) y los discos estériles de papel Whatman n°3 fueron previamente impregnados con 25ul del extracto y/o fracciones (según sea el caso) y posteriormente se dejaba evaporar el solvente usado (acetato de etilo) a medioambiente; una vez secos, eran colocados en placas hisopadas con bacteria.

3.6. Obtención de extracto de *Streptomyces* sp 6E3

3.6.1. Preparación de la cepa

La cepa de *Streptomyces* sp. 6E3 fue sembrada en tubos tapa rosca con 5mL caldo XGAL y se incubo a microaerofilia por un periodo de 5 días a 28°C. Luego se procedió a humedecer un hisopo, de manera estéril, dentro del caldo con la bacteria ya crecido y se hisopó en cuatro direcciones sobre la superficie de una placa con agar XGAL. Las placas hisopadas fueron puestas a incubar en

microaerofilia a 28°C por un lapso de 7 a 10 días o hasta la esporulación y cambio de coloración del medio.

3.6.2. Preparación del extracto

Para esta parte, se usó la metodología de Padilla, perteneciente al ICBM (52). Las placas con la cepa crecida fueron retiradas de incubación y se dejaron temperar por unos minutos. Para el proceso de remoción de células y extracción de metabolitos secundarios se utilizó el solvente acetato de etilo. La placa fue levemente inclinada y con ayuda de una micropipeta se bañó el cultivo con 3 mL del solvente. Con un asa de siembra circular se procedió al barrido de las células humedecidas por el solvente, llevándolas a un lado de la placa. Las células junto con el sobrenadante que resultó del barrido, fueron llevados a un tubo Falcón. Se trabajaron 30 placas y por cada 10 placas, su sobrenadante y células fueron llevados a tubos cónicos de 50mL.

Una vez realizado todo el barrido, se homogeneizó el contenido de los tubos y fueron llevados al sonicador para realizar el proceso de lisado celular. El equipo se programó para un tiempo de 15 minutos y a temperatura ambiente. Los tubos con las células lisadas fueron posteriormente llevados a centrifugación por 10 minutos a 5000 rpm. Luego se retiró el sobrenadante de cada tubo y se colocó en un balón esmerilado y se procedió a evaporar el solvente acetato de etilo en un rotavapor con una presión menor a 250 milibar y a temperatura de baño maría de 40°C. Cuando se retiró la mayor parte del solvente, lo sobrante en el balón fue trasvasado a un tubo eppendorf de 2mL, previamente pesado. La evaporación completa del solvente fue realizada con una corriente de gas nitrógeno. Para hallar el peso seco del extracto se realizó la siguiente fórmula:

$$\mathbf{Peso_{EX\ seco} = Peso_{EP+EX} - Peso_{EP}}$$

En donde: $Peso_{EX\ seco}$ = peso del extracto seco, $Peso_{EP+EX}$ = Peso del tubo eppendorf junto con extracto seco y $Peso_{EP}$ = Peso de tubo eppendorf vacío.

A este extracto se le realizó una cromatografía de capa fina usando una lámina cromatográfica de fase reversa (TLC Silicagel 60 RP-18 de Merck®) con una fase móvil de acetonitrilo:agua en proporción de 2:1 para observar, directamente

y sin revelador, el número de compuestos bajo una lámpara UV a 254 y 366nm, para esta parte. Además se realizó un antibiograma por medio del método de disco-difusión para determinar si aún permanecía el efecto antibacteriano.

3.7. Fraccionamiento del extracto medio de extracción de fase sólida (SPE) en columna

Para iniciar este procedimiento, se armó la columna, lo cual consistió en el lavado y secado inicial de la columna y del filtro que posee en la base de la misma. Se llenó la columna con la sílica en polvo tipo RP60 de Merck® y se lavó con metanol para arrastrar los residuos que puedan interferir en los resultados. Luego se pesó 50mg del extracto seco, se disolvió en menos de 400uL de acetato de etilo y se fue vertiendo en la columna por la parte superior. En una jeringa se cargaron 20mL de la fase móvil, las cuales estuvieron compuestas por acetonitrilo y agua en proporciones de 1:1, 1:2, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1 y 10:0, y con ayuda de un pistón que está adherido al pico de la jeringa, se inició la corrida cromatográfica añadiendo a presión la fase móvil a la columna. Las sustancias arrastradas junto con la fase móvil eran colectadas en tubos. Cada 4mL representaron una fracción y se les realizó una cromatografía de capa fina con el mismo tipo de lámina cromatográfica de fase reversa que se usó para analizar el extracto bruto y una fase móvil de acetonitrilo:agua en proporción 3:1, con el fin de observar, directamente y sin reveladores, que compuestos se están arrastrando con la fase móvil.

Los cromatogramas fueron visto a luz UV de 366nm en donde se observaba que se habían arrastrado los mismos componentes por lo que los contenidos de los tubos que presentaron estas características fueron puestos en balones para proceder al secado por medio del rotavapor con lo que se obtuvieron 6 fracciones. Se les realizó nuevamente una cromatografía de capa fina y un antibiograma según el método de disco-difusión para observar cuál de las fracciones tiene el efecto antimicrobiano.

3.8. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

3.8.1 Preparación de las diluciones de los extractos y de los antibióticos estándar

Para el caso de los antibióticos, se usaron Vancomicina y Penicilina, ambos estándares en polvo de Sigma. Para preparar la solución stock de antibiótico, se usó la siguiente fórmula:

$$W = \frac{(C \times V)}{P}$$

Dónde: W= peso del antibiótico en miligramos, C= concentración de la solución stock (ug/ml), V= volumen deseado para la solución (ml) y P= potencia antibiótica (ug/ml) dada por el fabricante (Vancomicina=987 ug/ml y Penicilina=998 ug/ml). El solvente inicial para ambas soluciones fue agua destilada y se esterilizó con un filtro de membrana de 0.2 micras. A partir de las soluciones stock, se prepararon diluciones que fueron las siguientes: 120, 60, 30, 15, 7.5, 3.75, 1.88, 0.98, 0.47, 0.23, 0.12, 0.06ug/ml respectivamente, las cuales fueron hechas con caldo Mueller-Hinton estéril.

Para el caso de las seis fracciones, estas fueron disueltas en 400ul de Dimetilsulfoxido (DMSO) para preparar soluciones stock y luego realizar las diluciones respectivas. Las cantidades usadas de las fracciones, para hacer las soluciones madre, fueron los siguientes: 0.5 mg de la Fracción B, 0.5mg de la Fracción C, 0.5mg de la Fracción D, 2mg de la Fracción E, 1mg de la Fracción F y 1mg de la Fracción F.

3.8.2. Método de Microdilución en caldo

Las cepas que fueron usadas para este método son *Staphylococcus aureus* Meticilino-resistente ATCC 43300, *Staphylococcus aureus* Meticilino-resistente de origen clínico y *Staphylococcus aureus* ATCC 33862. Se utilizó el método de Microdilución en caldo(53) modificado con las siguientes especificaciones. Las cepas indicadoras fueron activadas en caldo Mueller Hinton. La microplaca de 96 pozos fue retirada de su envase, en total esterilidad y a los pocillos que correspondían a las fracciones, se les agregó 90uL de caldo Mueller Hinton. Luego se les adicionaron 10uL de la suspensión de cepa indicadora, la cual para

este método, fue llevada a turbidez equivalente a la escala 0.5 de MacFarland. Finalmente, se le adicionaron 100uL de la dilución resultante de cada fracción.

Como control positivo, en una de las filas se usó Vancomicina como agente antimicrobiano para las cepas de *S. aureus* Meticilino Resistente y Penicilina para *S. aureus*, los cuales iban en un rango de 120 a 0.06ug/mL. El control negativo fue un caldo Mueller Hinton al que se le inocularon los 10uL de suspensión de cepa indicadora. El pozo blanco fue únicamente caldo estéril.

La microplaca fue incubada a 37°C por un periodo de 24 horas. Transcurrido el tiempo, se le agregaron 30uL de la solución al 0.1% de Cloruro de Trifeniltetrazolio o TTC (2,3,5-Trifeniltetrazolio Cloruro) y se reincubó a 37°C por 1 hora adicional. El viraje de la coloración del contenido de los pozos a rojo indicó el crecimiento microbiano.

A su vez, para corroborar el resultado que pudiese emitir el TTC y antes de añadir este mismo a los pozos, la microplaca fue puesta en una lectora de ELISA en la cual solo se midió la turbidez de cada pozo a 620nm. La CMI fue encontrada por medio de curvas, en donde se dio que la concentración que corresponde a la CMI se encuentra en el punto donde se inicia un fuerte decline de la absorbancia, esto de acuerdo a la metodología de Devienne et al.(54).

IV. RESULTADOS

4.1. Determinación de la Fase de Producción de metabolitos antibacterianos

En la observación macroscópica, se vio que entre los 7 a 10 días de crecimiento, se daba la excreción de una sustancia rojiza al borde de la colonia (Figura 4-A y Tabla 1) así como también un exudado con la misma tonalidad, el cual brotaba por medio de unos poros que se formaban mayormente en el centro de la colonia (Figura 4-B).

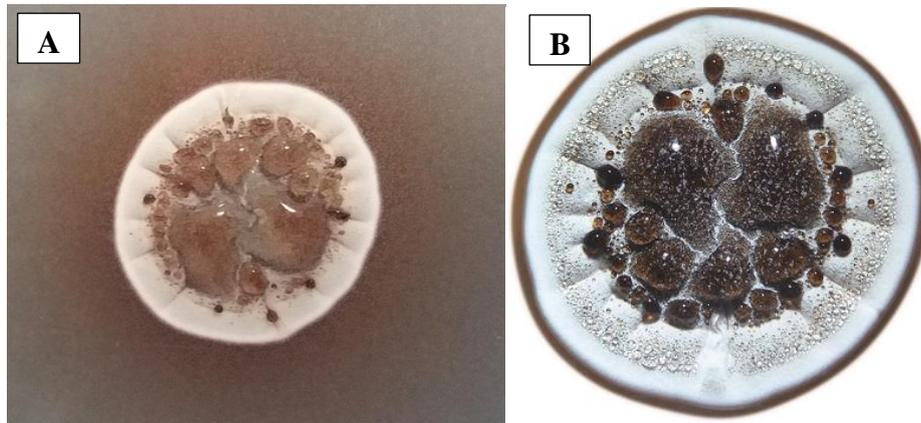


Figura 4. Observación macroscópica de la cepa *Streptomyces sp.* 6E3. En Figura A, observación del pigmento. En figura B, producción de exudado.

Al mismo tiempo, en la observación microscópica, se observó la presencia de las esporas (Figura 5 A y B y Tabla 1), lo cual determinaba que la fase micelial había culminado y por ende la producción de metabolitos también, basándonos en lo mencionado en la bibliografía.

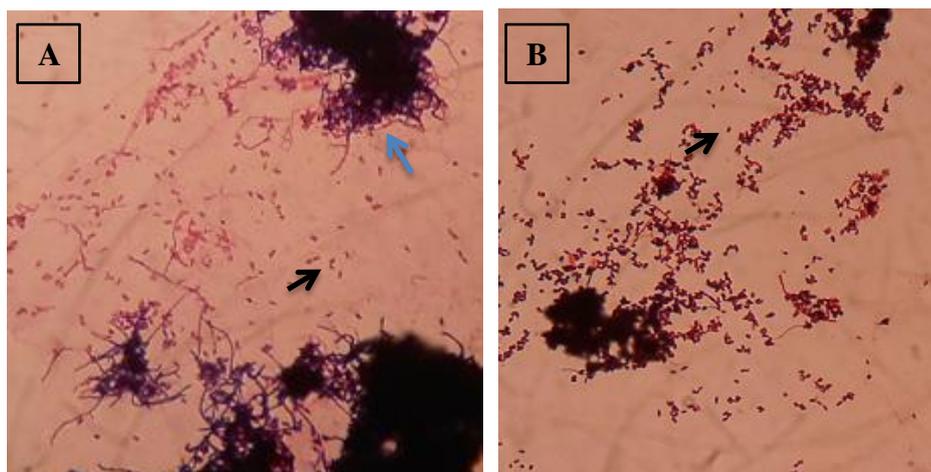


Figura 5. Tinción Gram a la cepa de *Streptomyces sp.* 6E3. En la figura A y B se observan las esporas (→) mientras que en la figura A se ve adicionalmente al micelio (→)

| Días de crecimiento | Observación Macroscópica | Observación Microscópica |
|----------------------------|---|--|
| 1 – 2 días | Colonia pequeña, puntiforme y lisa. | Presencia de filamentos |
| 3 – 4 días | Colonia de borde entero. Superficie lisa. | Presencia de filamentos |
| 5 – 6 días | Colonia de borde entero y apariencia pulverulenta. | Presencia de filamentos |
| 6 – 7 días | Colonia de borde entero y apariencia pulverulenta. Color blanco. | Presencia de filamentos, filamentos septados y algunas esporas. |
| 7 – 10 días | Colonia grande, de borde blanco y ploma en el centro. Presencia de porosidades y exudado color caramelo. Color anaranjado oscuro en el envés. | Presencia de filamentos, filamentos septados, esporas y esporas en cadena. |

Tabla 1. Cuadro de observaciones macroscópica y microscópica de la cepa *Streptomyces sp.* 6E3.

4.2. Determinación de actividad antimicrobiana por método de “Doble Capa”.

La cepa de *Streptomyces sp.* 6E3 presentó actividad frente a todas las cepas indicadora. Cabe resaltar que la actividad que presentó frente a la cepa de *S.aureus ATCC 43300*, (Figura 6-A) con un promedio de porcentaje de inhibición de 66.7% (Tabla 2-B).

Tabla 2.- Actividad antibacteriana de cepa *Streptomyces sp.* 6E3 por método de doble capa. (A) Valores de los experimentos y (B) promedio

(A)

| Cepa | Primer Experimento | | | Segundo Experimento | | |
|--------------------------------|--------------------|---------|-------------|---------------------|---------|-------------|
| | Medida Total | Colonia | %Inhibición | Medida Total | Colonia | %Inhibición |
| S. aureus ATCC 33862 | 41 | 29 | 70.7 | 43 | 28 | 65.1 |
| S.aureus ATCC 43300* | 31 | 21 | 67.7 | 35 | 23 | 65.7 |
| S. aureus Cepa Clínica* | 40 | 23 | 57.5 | 42 | 23 | 54.8 |

*Cepas Meticilino Resistentes

(B)

| Cepa | Medida Total (mm) | Colonia (mm) | % Inhibición |
|--------------------------------|-------------------|--------------|--------------|
| S. aureus ATCC 33862 | 42 | 28.5 | 67.9 |
| S.aureus ATCC 43300* | 33 | 22 | 66.7 |
| S. aureus cepa clinica* | 41 | 23 | 56.1 |

*Cepas Meticilino Resistentes

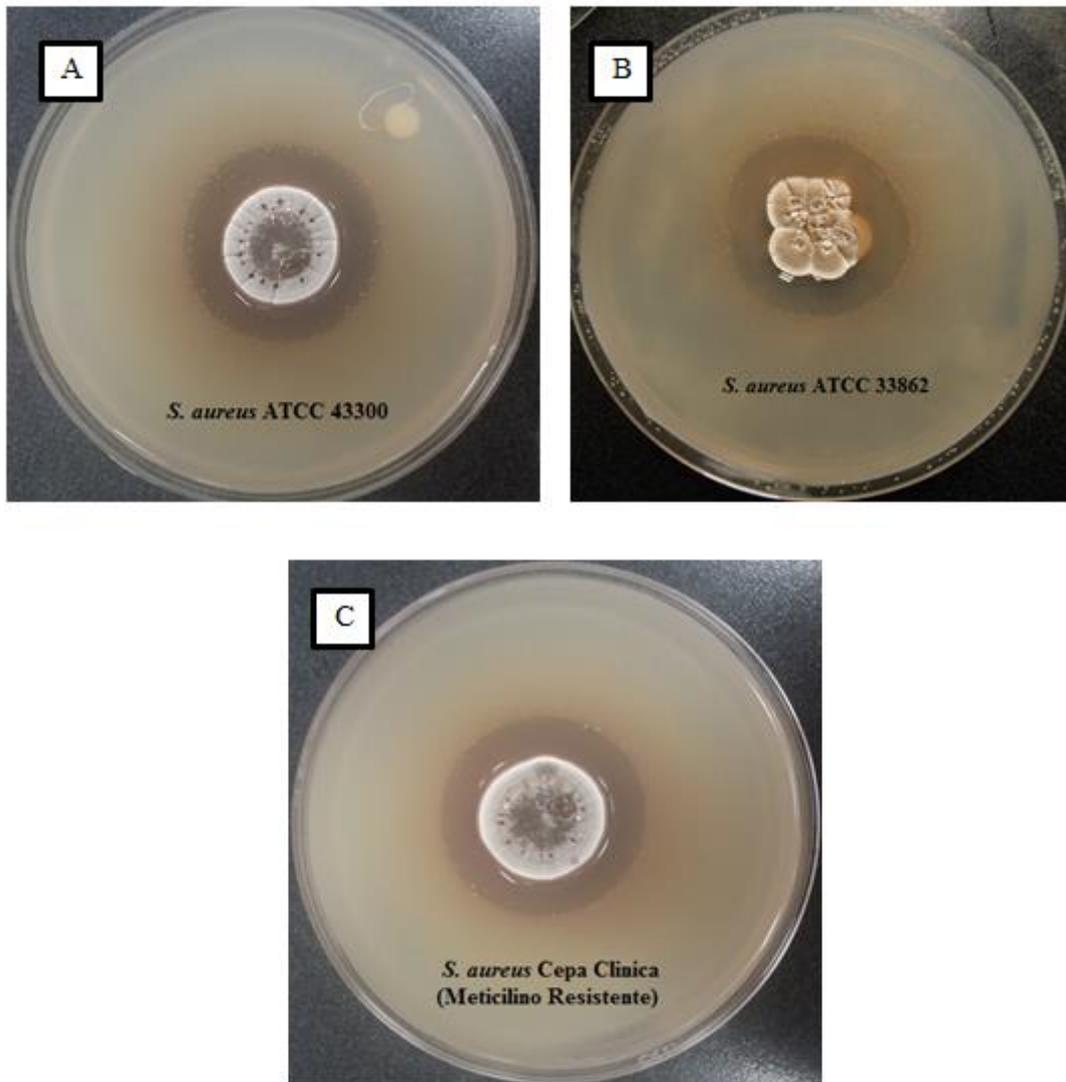


Figura 6. Determinación de actividad antimicrobiana por método de Doble Capa. Enfrentamiento contra (A) *S. aureus* ATCC 43300, (B) *S. aureus* ATCC 33862 y (C) *S. aureus* cepa clínica (meticilino resistente).

4.3. Extracto bruto, comprobación de actividad y cromatografía para observación del número de compuestos.

Se utilizaron 30 placas cultivadas para la obtención del extracto, con lo cual se obtuvieron 141.9 mg.

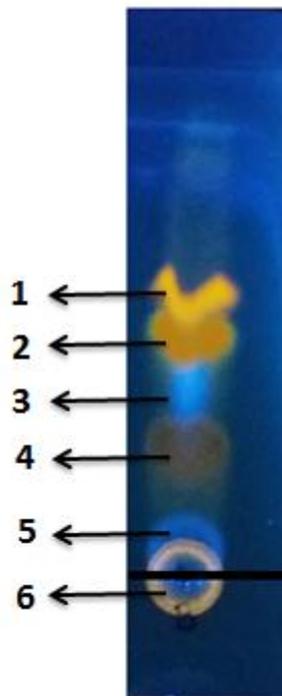
Se comprobó la actividad del extracto y se corroboró, nuevamente, la actividad frente a las cepas de *S. aureus* ATCC 43300 (Tabla 3).

Tabla 3. Actividad antibacteriana del extracto bruto de la cepa 6E3 por método de disco difusión o Kirby Bauer.

| Cepa | Halo (mm) | | Promedio |
|--------------------------------|-----------|----------|----------|
| | 1er Exp. | 2do Exp. | |
| <i>S. aureus</i> ATCC 33862 | 12 | 14 | 13 |
| <i>S.aureus</i> ATCC 43300* | 16 | 16 | 16 |
| <i>S. aureus</i> cepa clínica* | 15 | 15 | 15 |

* Cepas Meticilino Resistente

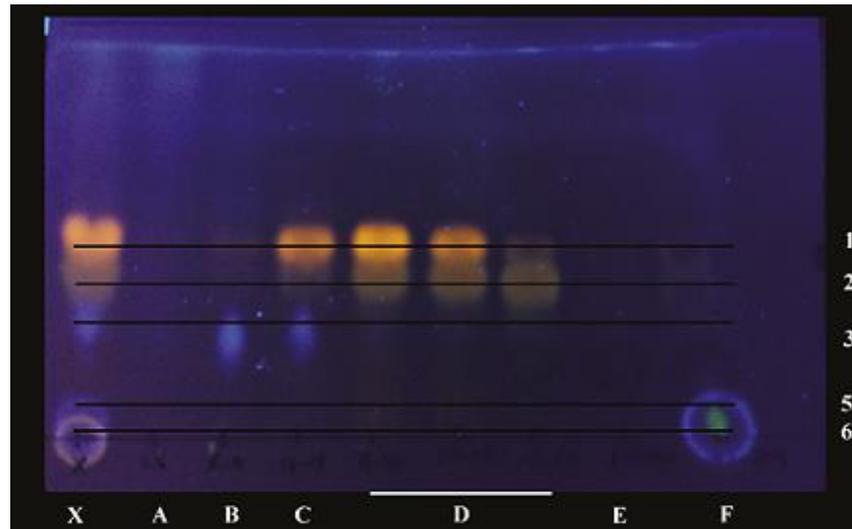
Figura 7. Cromatografía del extracto bruto.



4.4. Fraccionamiento del extracto

Se obtuvieron 9 fracciones (Figura 8), de los cuales las fracciones 15-16, 17-18 y 19-23 fueron unidas por tener perfiles cromatográficos similares, con lo cual quedarían 6 fracciones denominadas como A (tubos 1-5), B (tubos 6-11), C (fracciones 13-14), D (fracciones 15-23), E (fracciones 24-30) y F (fracciones 31-39) respectivamente. En la figura 8-A se aprecian las manchas cromatograficas 1, 2, 3, 5 y 6 a 366nm y en la figura 8-B está la macha 4 observada a 254 nm. Los Rf's de las manchas cromatográficas en cada fracción, coordinan con los Rf's obtenidos del extracto bruto (Tabla 4), siendo las manchas 1 y 2 los más comunes en las fracciones. La única mancha que no aparece en ninguna de las fracciones es el número 6, que es observado en la línea de partida de la corrida del extracto bruto.

A.



B.

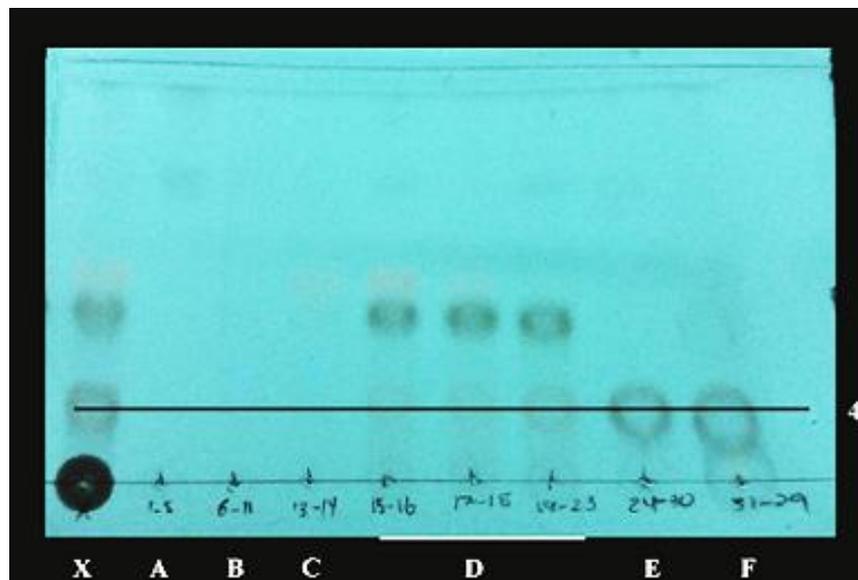


Figura 8. Observación de las fracciones en placas cromatográficas bajo lámpara UV a longitud de onda de 366 nm (A) y 254 nm (B)

Tabla 4. Valor de Rf's obtenidas de las fracciones

| Compuesto | Rf | | | | | | |
|-----------|-------|----|-------|-------|-------|-------|-------|
| | X | FA | FB | FC | FD | FE | FF |
| 1 | 0.474 | - | 0.447 | 0.447 | 0.474 | 0.447 | 0.447 |
| 2 | 0.368 | - | 0.395 | 0.395 | 0.395 | 0.368 | 0.368 |
| 3 | 0.263 | - | 0.237 | 0.237 | - | - | - |
| 4 | 0.158 | - | - | - | - | 0.158 | 0.158 |
| 5 | 0.105 | - | - | - | - | - | 0.095 |
| 6 | 0.000 | - | - | - | - | - | - |

X = Extracto bruto

Para corroborar la actividad de cada fracción, se volvió a realizar un antibiograma (Tabla 5), en el que se observó que cinco de las seis fracciones presentaron actividad antibacteriana. Se destaca la actividad de las demás fracciones frente a las cepas de *S. aureus* meticilino resistentes, tanto para la cepa estándar como para la cepa clínica.

Tabla 5. Actividad antibacteriana de las fracciones por método de disco difusión.

| Cepa | Halo de las Fracciones (mm) | | | | | |
|--------------------------------|-----------------------------|----|----|----|----|----|
| | A | B | C | D | E | F |
| <i>S. aureus</i> ATCC 33862 | 0 | 13 | 10 | 14 | 8 | 0 |
| <i>S. aureus</i> ATCC 43300* | 0 | 13 | 14 | 11 | 10 | 15 |
| <i>S. aureus</i> cepa clínica* | 0 | 12 | 13 | 11 | 9 | 13 |

*Cepas Meticilino Resistentes

4.5. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de microdilución.

La CMI fue corroborada por medio del indicador TTC así como por lectura de absorbancias en donde se encontró el punto de corte para las fracciones. La CMI para Penicilina frente a la cepa *S. aureus* ATCC 33862 fue de 0.06ug/ml y para Vancomicina frente a las cepas *S. aureus* ATCC 43300 y *S. aureus* cepa clínica (ambas meticilino resistentes) fueron de 0.12 y 0.47 ug/ml, respectivamente.

Para el caso de las fracciones, se vio que la Fracción D tuvo mayor inhibición frente a las tres cepas de *S. aureus*, a diferencia de las otras fracciones.

Tabla 6. Concentración Mínima Inhibitoria de las fracciones.

| Cepa | CMI (ug/ml) de las Fracciones | | | | |
|--------------------------------|-------------------------------|------|-------------|-------|------|
| | B | C | D | E | F |
| <i>S. aureus</i> ATCC 33862 | 8.13 | 8.13 | 0.88 | 2.19 | 8.75 |
| <i>S. aureus</i> ATCC 43300* | 8.13 | 8.13 | 0.44 | 2.19 | 2.19 |
| <i>S. aureus</i> cepa clínica* | 16.3 | 16.3 | 1.76 | 4.375 | 8.75 |

*Cepa Meticilino Resistente

Fig. 9. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de las fracciones frente a *S. aureus* ATCC 43300 meticilino-resistente. Fotografía (A), Esquema de diluciones en ug/ml (B) y Curva del efecto de la fracción D (C).

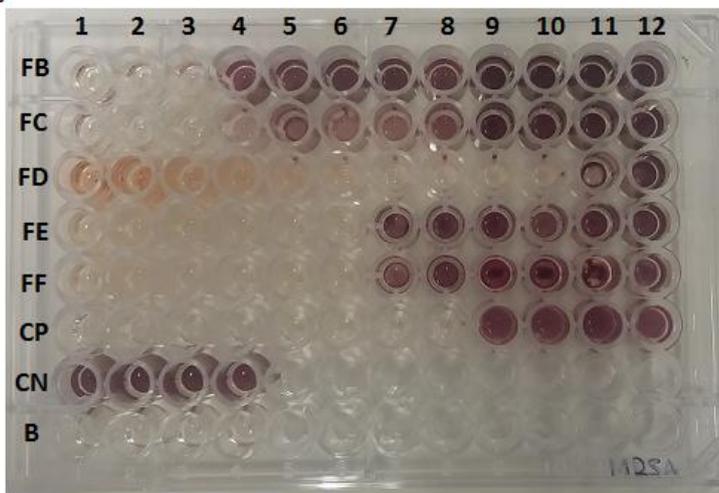
FB – FF: Fracciones B, C, D, E y F.

CP: Control positivo (CMI de vancomicina frente a cepa indicador)

CN: Control negativo (Caldo Mueller Hinton con cepa indicador)

B: Blanco (Caldo Mueller-Hinton)

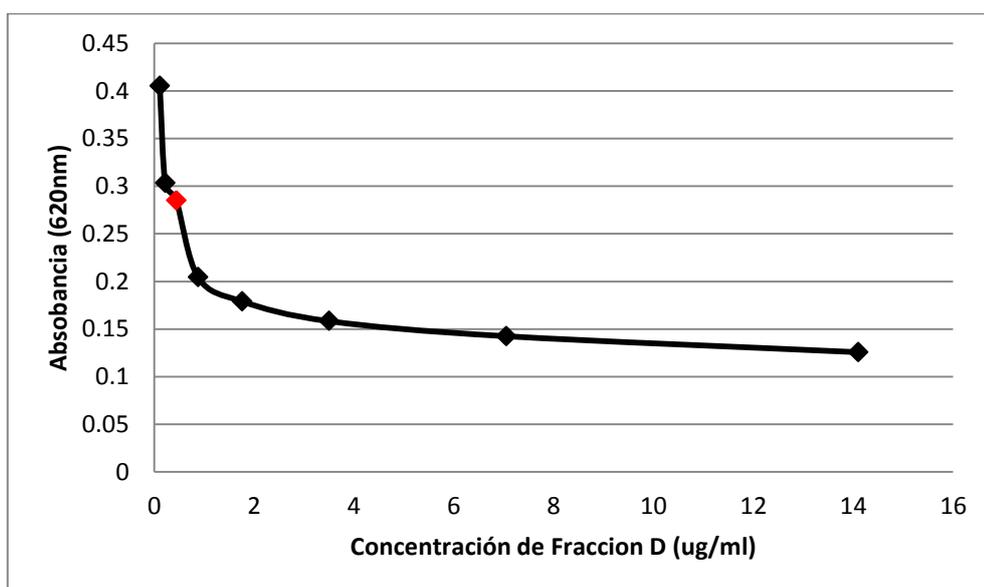
(A)



(B)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----|-----|-------|------|------|------|------|------|------|-------|------|------|-------|
| B | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | 0.5 | 0.25 | 0.125 | 0.06 | 0.03 | 0.015 |
| C | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | 0.5 | 0.25 | 0.125 | 0.06 | 0.03 | 0.015 |
| D | 225 | 112.5 | 56.3 | 28.1 | 14.1 | 7.05 | 3.5 | 1.76 | 0.88 | 0.44 | 0.22 | 0.11 |
| E | 70 | 35 | 17.5 | 8.8 | 4.4 | 2.2 | 1.1 | 0.55 | 0.27 | 0.44 | 0.07 | 0.035 |
| F | 70 | 35 | 17.5 | 8.8 | 4.4 | 2.2 | 1.1 | 0.55 | 0.27 | 0.14 | 0.07 | 0.035 |
| CP | 120 | 60 | 30 | 15 | 7.8 | 3.75 | 1.88 | 0.98 | 0.47 | 0.23 | 0.12 | 0.06 |
| CN | | | | | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | | | |

(C)



V. DISCUSION

En los resultados obtenidos por el método de Doble Capa (Tabla 2) se vio que la cepa de *Streptomyces*, mostró actividad frente a las tres cepas de *S. aureus*, dentro de las que se incluyen a las meticilino-resistente. Si bien es cierto de que muchos antibióticos producidos por el género *Streptomyces* actúan frente a Gram positivos como negativo; entre los antibióticos más conocidos y que atacan a las bacterias Gram positivas, están la vancomicina(55) y daptomicina(56), que son producidos por otras especies de *Streptomyces*.

Es necesario mencionar que antes de iniciar con el método de Doble Capa fue necesario encontrar el momento en el que la cepa de *Streptomyces sp.* 6E3 producía los metabolitos. Según la bibliografía, las bacterias del género *Streptomyces* crecen en un periodo de 5 a 7 días a 28°C y que durante la etapa micelial es donde se da la producción de metabolitos secundarios(28), es por ello que durante los dos últimos días de crecimiento (experimentalmente se vio un crecimiento en un periodo de 7 a 10 días) se llevó a cabo un reconocimiento por medio de tinción Gram para así conocer aproximadamente en que día se daba la fase micelial de la cepa trabajada. Adicionalmente, durante los mismos días se realizaron pruebas piloto del método de Doble capa para el mismo reconocimiento; permitiendo la determinación del tiempo en el que la cepa sintetizaba el compuesto. El tiempo aproximado en que la cepa producía el metabolito iba en relación con la producción de un pigmento que era liberado al medio de cultivo, tiñendo de color naranja oscuro todo el borde de la colonia crecida. Existen casos en el que los pigmentos producidos por cepas de *Streptomyces* son los responsables de la actividad antimicrobiana de la cepa, es así el caso de la roseoflavina(57) e incluso, en *Streptomyces coelicolor*, donde se da la producción de dos pigmentos con actividad antimicrobiana siendo uno de ellos, la actinorrodina(58). Estos antecedentes con respecto a otras cepas del mismo género nos llevan a decir que posiblemente, el pigmento liberado por la cepa *Streptomyces sp.* 6E3, que además de ser parte de sus características fenotípicas, sea el que tenga la actividad antimicrobiana.

En el caso del extracto y como se mencionó anteriormente, se obtuvo a partir de las células bacterianas recolectadas de las placas sembradas. Todas las placas fueron expuestas a las mismas condiciones que aquellas con las que se realizaría el método de

Doble Capa. El medio que se utilizó para el crecimiento de esta bacteria fue el medio XGAL, el cual es un medio modificado a partir del medio Glicerol-Asparagina Agar (Pridham&Lyons) (59), y ha sido usado por el laboratorio que brindó la cepa por favorecer el crecimiento de la cepa. Dentro de los ingredientes del medio, hay nutrientes como el glicerol y fosfato dipotásico (K_2HPO_4) que de acuerdo al Manual Bergey(25), se encuentran dentro de los principales medios para aislamiento y cultivo de actinomicetos. Este medio también favorece la esporulación de la cepa, lo cual era demostraba que ésta ya había producido el/los compuestos activos. Según menciona Kutzner(60), una proporción correcta entre fuentes de carbono y nitrógeno dentro del medio de crecimiento, mejoraría la producción de esporas por parte de la bacteria. Esto último fue útil para el trabajo, ya que el proceso de extracción fue realizado a partir del barrido de la parte micelial que se encontraba en la parte exterior del agar y la presencia de esporas nos servía como un indicativo de que la fase micelial había culminado, por lo cual se podía iniciar con el proceso extractivo. No se escogió un día exacto después de la siembra inicial para realizar la recolección, debido a que el tiempo de desarrollo de la cepa oscilaba entre cinco a siete días y en ocasiones esto podía llegar hasta nueve días a pesar de las mismas condiciones de incubación que se le dio, mencionándose adicionalmente, que esto no cambió a los productos finales en cuanto a actividad ni cantidad obtenida.

El método extractivo realizado en este trabajo ayudó a obtener una cantidad considerable de extracto. Antes de escoger este método, se realizó a modo de prueba piloto el método convencional de fermentación en caldo, pero no fue muy eficiente ya que la cantidad de extracto obtenida fue una tercera parte del extracto que se obtuvo por placa tratada. Esto pudo deberse a que, aunque la bacteria excretaba los metabolitos, esto no era en gran medida como lo que pudiese tener intracelularmente. Muy pocos son los microorganismos que en su interior acumulan metabolitos secundarios, ya que la mayoría de ellos tiende a excretarlos por lo mismo de que pueden ser tóxicos en su interior (17).

Es aún incierto si esta cepa de *Streptomyces* acumula una gran cantidad de metabolitos activos en su interior, esto debido a que en el método extractivo que se usó, solo se realizó la cosecha de las células en la superficie del agar con ayuda del solvente pero no la extracción en conjunto con el agar. De haber sido el caso de realizar una extracción

con todo el contenido de la placa, es muy probable que se haya encontrado una mayor cantidad de metabolitos, ya que el microorganismo durante la fase micelial, excreta los metabolitos secundarios y estos se acumulan en el medio donde ha crecido (61).

Para el caso de esta cepa se han encontrado seis posibles metabolitos, según las manchas que fueron detectadas por medio de una cromatografía de capa fina, de los cuales se deduce que las manchas cromatográficas 1 y 2 tendrían la actividad antimicrobiana buscada en este microorganismo, pero que aún faltaría corroborar. El número de metabolitos encontrados no es de extrañar (en caso las manchas represente metabolitos puros), ya que muchas de las especies del género *Streptomyces* producen más de un metabolito, entre antimicrobianos y no antimicrobianos. Así es el caso de otras cepas de *Streptomyces* a las cuales se le han encontrado más de uno o más compuestos según el extracto obtenido (el cual depende del solvente y de la capacidad de arrastre según su polaridad y la de los compuestos)(62, 63) y de los cuales solo algunos tendrán actividad antimicrobiana, como es el caso de *Streptomyces coelicolor* que además de producir la actinhorodina también produce otros compuestos relacionados con actividad antimicrobiana (58) o como *Streptomyces violaceusniger* que produce un antibacteriano y un antifúngico(64).

Los resultados obtenidos de la prueba de mínima concentración inhibitoria de las fracciones, muestra que la fracción D es la que presentó mayor actividad. En esta fracción se encuentran los compuestos 1 y 2 en una mayor concentración, lo que estaría indicando que es muy posible que ambos compuestos sean quienes tienen la actividad antimicrobiana frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*. En los métodos usados para determinar el punto de la mínima concentración inhibitoria, se hizo la lectura utilizando el reactivo cloruro de tetrazolio o TTC (2,3,5 – Trifeniltetrazolio cloruro), el cual fue muy útil para determinar la cantidad de bacterias vivas por medio de la detección de la respiración celular. Este método fue útil para la simple observación en placa, pero para corroborar el punto de CMI, se realizó también una lectura de resultados en un lector de ELISA. Ambos métodos ayudaron a corroborar los resultados que fueron obtenidos al final de esta parte experimental, siendo la MIC más baja la de 0.44mg obtenido con la fracción D y frente a *S. aureus* ATCC 43300 meticilino resistente.

El resultado obtenido, ya sea de CMI o antibiograma, frente a cepas de *S. aureus* también ha sido observado en otras cepas de *Streptomyces* spp. aisladas, como es

el caso de la reportada cepa del mismo género con codificación ERI-6, en donde se encontraron MIC's de 1.5mg hasta 3mg que fue realizado con el extracto bruto(62); otro es el caso de una cepa aislada productora de un policétido que tiene actividad frente a muchas cepas patógenas pero teniendo mejores resultados con cepas gram positivas, siendo una de ellas una MRSA (MethicilinResistant *S. aureus*)(65). Entre otros resultados frente a cepas de *S. aureus*, se encuentra el caso de un estudio peruano en donde se encontró una MIC del extracto bruto frente a un *S. aureus* metilino resistente con un valor de 7.9 ug/ml con una cepa de origen marino que se encuentra dentro del género *Streptomyces* y es potencialmente activa frente a cepas de origen clínico (48, 66); pero mientras que en dicho estudio se obtuvo un valor alto para la MIC, en otros estudios se ha visto que usando el extracto bruto se han obtenido valores de 0.125ug/ml frente a *S.aureus*(67). Se ha reportado también que en cepas de aisladas de la Bahía de Bengal, se han encontrado que de un cierto número de los aislados con actividad antibacteriana, la mayoría de ellos lo era frente a gram positivos como *S. aureus* y *B. subtilis*(68). Se ha informado también, que cepas del género *Streptomyces*, han hecho asociación con otros organismos vivos y han presentado una actividad antimicrobiana con mucho potencial (69, 70); siendo una de dichas cepas, asociada a un tipo de coral y presentando actividad frente a cepas de MRSA productora y no productora de biofilm.

Esta actividad frente a cepas de *S. aureus* sean o no sean metilino resistentes y/o frente a otras cepas patógenas, ha sido observado en otros géneros de la familia de los actinomicetos, como es el caso de una especie de *Actinomaduras*spp. productora de un antimicrobiano llamado chandrananimicina(71) o de *Actinopolysporas*spp., que presenta una fuerte actividad frente *S. aureus* y *B. subtilis*(72); por esto podría decirse que la producción de sustancias antimicrobiana de los actinomicetos y por ende del genero *Streptomyces*spp., está más arraigado a tener actividad frente a cepas bacterianas gram positivas .

VI. CONCLUSIONES

- La fase de producción de los metabolitos activos que produce *Streptomyces sp* 6E3 se da durante los 7 a 10 días de crecimiento.
- La cepa *Streptomyces sp.* 6E3 presento actividad frente a las cepas *S. aureus* ATCC 33862, *S. aureus* ATCC 43300 y *S. aureus* cepa clínica metilino resistente.
- Mediante la prueba de TLC se demostró que en el extracto de acetato de etilo se presentaron seis compuestos, cinco de ellos activos frente a UV a 366nm.
- El extracto de acetato de etilo obtenido de la cepa de *Streptomyces sp.* 6E3 presenta actividad antimicrobiana ante las cepas indicadoras.
- Una de las 6 fracciones obtenidas, no presento actividad antimicrobiana según el método de Kirby-Bauer.
- La CMI de la fracción D para *S. aureus* ATCC 43300 (Meticilino Resistente) fue la más baja, con 0.44ug/ml.

VII. RECOMENDACIONES

- Determinar y purificar el/los metabolitos 1 y 2 quienes serían responsables de la actividad antimicrobiana del extracto que están presentes en la fracción D.
- Caracterizar química y fisicoquímicamente los metabolitos activos.
- Realizar pruebas de toxicidad de los metabolitos activos.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Sipos P, Györy H, Hagymási K, Ondrejka P, Blázovics A. Special wound healing methods used in ancient Egypt and the mythological background. *World Journal of Surgery*. 2004;28(2):211-6.
2. Bassett E, Keith M, Armelagos G, Martin D, Villanueva A. Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (A.D. 350). *Science*. 1980;209(4464):1532-4.
3. Aminov RI. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Frontiers in Microbiology*. 2010;1:134.
4. Madigan MM, J.; Dunlap, P.; Clark, D. Brock: *Biología de los Microorganismos*. 12th ed: Pearson Educacion S.A.; 2011. 1296 p.
5. Bax RP. Antibiotic Resistance: A View from the Pharmaceutical Industry. *Clinical Infectious Diseases*. 1997;24(Supplement 1):S151-S3.
6. Cohen ML. Changing patterns of infectious disease. *Nature*. 2000;406(6797):762-7.
7. Spellberg B, Guidos R, Gilbert D, Bradley J, Boucher HW, Scheld WM, et al. The Epidemic of Antibiotic-Resistant Infections: A Call to Action for the Medical Community from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 2008;46(2):155-64.
8. WHO. Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance. In: Organization WH, editor. Geneva, Switzerland: World Health Organization (WHO); 2015.
9. CDC. Antibiotic Resistance Solutions Initiative Centers of Disease Control and Prevention (CDC)2016 [updated 1 de Junio de 2016. Available from: <http://www.cdc.gov/drugresistance/solutions-initiative/index.html>.
10. Clardy J, Fischbach MA, Currie CR. The natural history of antibiotics. *Current Biology*. 2009;19(11):R437-R41.
11. Waksman SA. What Is an Antibiotic or an Antibiotic Substance? *Mycologia*. 1947;39(5):565-9.
12. Tortora G, Funke B, Case C. *Microbiology: An Introduction*. 8th ed. ed. United States of America: Pearson Education, Inc.; 2007.
13. Berdy J. Bioactive Microbial Metabolites. *J Antibiot*. 2005;58(1):1-26.

14. Barrios-González J, Mejía A. Production of Antibiotics and other Commercially Valuable Secondary Metabolites. In: Pandey A, Soccol CR, Larroche C, editors. Current Developments in Solid-state Fermentation. New York, NY: Springer New York; 2008. p. 302-36.
15. Challis GL, Hopwood DA. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2003;100 Suppl 2:14555-61.
16. Khumbar C, Watve MG. Why antibiotics: A comparative evaluation of different hypotheses for the natural role of antibiotics and an evolutionary synthesis. Natural Science. 2013;5:26-40.
17. Vining L. Functions of Secondary Metabolites. Annual Review of Microbiology. 1990;44:395 - 427.
18. Ueda K, Kawai S, Ogawa H-o, Kiyama A, Kubota T, Kawanobe H, et al. Wide Distribution of Interespecific Stimulatory Events on Antibiotics Production and Sporulation Among *Streptomyces* species. The Journal of Antibiotics. 2000;53(9):979 - 82
19. Xiao Y, Wei X, Ebricht R, Wall D. Antibiotics Production by Myxobacteria Plays a Role in Predation. Journal of Bacteriology. 2011;193(18):4626 - 33.
20. Malerba F, Orsenigo L. Innovation and market structure in the dynamics of the pharmaceutical industry and biotechnology: towards a history-friendly model. Industrial and Corporate Change. 2002;11(4):667-703.
21. Zaffiri L, Gardner J, Toledo-Pereyra LH. History of Antibiotics. From Salvarsan to Cephalosporins. Journal of Investigative Surgery. 2012;25(2):67-77.
22. Sharma M. Actinomycetes: Source, Identification and Their Applications. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2014;3(2):801-32.
23. H A Lechevalier a, Lechevalier MP. Biology of Actinomycetes. Annual Review of Microbiology. 1967;21(1):71-100.
24. M Goodfellow a, Williams ST. Ecology of Actinomycetes. Annual Review of Microbiology. 1983;37(1):189-216.
25. Goodfellow M, Kampfer P, Busse H, Trujillo M, Suzuki K-i, Ludwig W, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Five: The Actinobacteria, Part A. 2nd ed. United States of America: Springer; 2012. 2083 p.

26. Yagüe P, Lopez-Garcia MT, Rioseras B, Sanchez J, Manteca A. New insights on the development of *Streptomyces* and their relationships with secondary metabolite production. *Current trends in microbiology*. 2012;8:65-73.
27. Pamboukian CRD, Guimarães LM, Facciotti MCR. Applications of image analysis in the characterization of *Streptomyces olindensis* in submerged culture. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2002;33:17-21.
28. Manteca A, Sanchez J. *Streptomyces* developmental cycle and secondary metabolite production. *Curr Res Technol Educ Top Appl Microbiol Microb Biotechnol*. 2010;1:560-6.
29. Braun S, Vecht-Lifshitz SE. Mycelial morphology and metabolite production. *Trends in Biotechnology*. 1991;9(1):63-8.
30. Pamboukian CRD, Facciotti MCR. Production of the antitumoral retamycin during continuous fermentations of *Streptomyces olindensis*. *Process Biochemistry*. 2004;39(12):2249-55.
31. Manteca A, Alvarez R, Salazar N, Yagüe P, Sanchez J. Mycelium Differentiation and Antibiotic Production in Submerged Cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008;74(12):3877-86.
32. Yang YK, Morikawa M, Shimizu H, Shioya S, Suga K-I, Nihira T, et al. Image analysis of mycelial morphology in virginiamycin production by batch culture of *Streptomyces virginiae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1996;81(1):7-12.
33. Schatz A, Bugle E, Waksman SA. Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria.*†. *Experimental Biology and Medicine*. 1944;55(1):66-9.
34. de Lima Procópio RE, da Silva IR, Martins MK, de Azevedo JL, de Araújo JM. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2012;16(5):466-71.
35. Chater KF. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2006;361(1469):761-8.
36. Reading C, Cole M. Clavulanic Acid: a Beta-Lactamase-Inhibiting Beta-Lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1977;11(5):852-7.

37. Morales Y, Herrera C, Muñoz J. Cloranfenicol, un antibiotico clasico como alternativa en el presente. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*. 2007;38(1):58-69.
38. Araos R, García P, Chanqueo L, Labarca J. Daptomicina: características farmacológicas y aporte en el tratamiento de infecciones por cocáceas gram positivas. *Revista chilena de infectología*. 2012;29:127-31.
39. Alder JD. Daptomycin, a new drug class for the treatment of Gram-positive infections. *Drugs Today*. 2005;41(2):81-90.
40. Sr SK, Rao KVB. In-vitro antimicrobial activity of marine actinobacteria against multidrug resistance *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012;2(10):787-92.
41. Hozzein WN, Rabie W, Ali MIA. Screening the Egyptian desert actinomycetes as candidates for new antimicrobial compounds and identification of a new desert *Streptomyces* strain. *African Journal of Biotechnology*. 2011;10(12):2295-301.
42. Yücel S, Yamaç M. Selection of *Streptomyces* isolates from Turkish karstic caves against antibiotic resistant microorganisms. *Pak J Pharm Sci*. 2010;23(1):1-6.
43. Li J, Zhao GZ, Chen HH, Wang HB, Qin S, Zhu WY, et al. Antitumour and antimicrobial activities of endophytic *Streptomyces* from pharmaceutical plants in rainforest. *Letters in applied microbiology*. 2008;47(6):574-80.
44. Matsubara A, Hurtado JE, editors. Isolation and Characterization of Actinomycetes from Acidic Cultures of Ores and Concentrates. *Advanced Materials Research*; 2013: Trans Tech Publ.
45. Moraga NB, Poma HR, Amoroso MJ, Rajal VB. Isolation and characterization of indigenous *Streptomyces* and *Lentzea* strains from soils containing boron compounds in Argentina. *Journal of Basic Microbiology*. 2014;54(6):568-77.
46. Dolotkeldieva T, Totubaeva N. Biodiversity of *Streptomyces* of high-mountainous ecosystems of Kyrgyzstan and its biotechnological potential. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2006;89(3):325-8.
47. Kay S, Pathom-aree W, Cheeptham N. Screening of volcanic cave actinomycetes for antimicrobial activity against *Paenibacillus larvae*, a honey bee pathogen. *Chiang Mai Journal of Science*. 2013;40:26-33.
48. León J, Aponte JJ, Rojas R, Cuadra DL, Ayala N, Tomás G, et al. Estudio de actinomicetos marinos aislados de la costa central del Perú y su actividad antibacteriana

frente a *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistentes y *Enterococcus faecalis* Vancomicina Resistentes. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. 2011;28:237-46.

49. Navarro M, León J, Huamán M, De Amat C, Morales M, Flores L, et al. Identificación de un Complejo Antimicrobiano Natural, producido por *Streptomyces californicus* 13A2 inhibidor de bacterias Lactámicos-resistentes de origen hospitalario aisladas del Instituto Nacional Materno Perinatal de Lima, Perú. *Vitae*. 2014;21(1):59-60.

50. Singh LS, Baruah I, Bora T. Actinomycetes of Loktak habitat: isolation and screening for antimicrobial activities. *Biotechnology*. 2006;5(2):217-21.

51. Rojas J, García A, López A. Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2005;4(2):28-32.

52. Padilla G. Método de extracción de compuestos a partir de células bacterianas. Oral Comunicación. In: Ampuero A, editor. 2015.

53. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protocols*. 2008;3(2):163-75.

54. Devienne KF, Raddi MSG. Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2002;33:166-8.

55. Rybak MJ, Hershberger E, Moldovan T, Grucz RG. In vitro activities of daptomycin, vancomycin, linezolid, and quinupristin-dalfopristin against staphylococci and enterococci, including vancomycin-intermediate and-resistant strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000;44(4):1062-6.

56. Streit JM, Jones RN, Sader HS. Daptomycin activity and spectrum: a worldwide sample of 6737 clinical Gram-positive organisms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004;53(4):669-74.

57. Otani S, TAKATSU M, NAKANO M, KASAI S, MIURA R, MATSUI K. Roseoflavin, a new antimicrobial pigment from streptomyces. *The Journal of Antibiotics*. 1974;27(1):88-9.

58. Bystrykh LV, Fernández-Moreno MA, Herrema JK, Malpartida F, Hopwood DA, Dijkhuizen L. Production of actinorhodin-related "blue pigments" by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*. 1996;178(8):2238-44.
59. Shirling Et, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species I. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1966;16(3):313-40.
60. Kutzner H. The family streptomycetaceae. *The prokaryotes*. 1981;2:2028-90.
61. Chater KF, Merrick MJ. *Streptomyces* In: Parish JH, editor. *Developmental Biology of Prokaryotes*. Oxford, UK: Blackwell 1979. p. 93 - 114.
62. Arasu MV, Duraipandiyan V, Agastian P, Ignacimuthu S. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*. 2009;19(1):22-8.
63. Ilic SB, Konstantinovic SS, Todorovic ZB, Lazic ML, Veljkovic VB, Jokovic N, et al. Characterization and antimicrobial activity of the bioactive metabolites in streptomycete isolates. *Microbiology*. 2007;76(4):421-8.
64. Tripathi CKM, Praveen V, Singh V, Bihari V. PRODUCTION OF ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL METABOLITES BY *STREPTOMYCES VIOLACEUSNIGER* AND MEDIA OPTIMIZATION STUDIES FOR THE MAXIMUM METABOLITE PRODUCTION. *Medicinal Chemistry Research*. 2004;13(8):790-9.
65. Sujatha P, Bapi Raju KVVS, Ramana T. Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiological Research*. 2005;160(2):119-26.
66. Aponte J, León J, Rojas R, Montero S, Loayza L. Actividad antimicrobiana y sinérgica de metabolitos producidos por *Streptomyces erythrogriseus* M10-77 de origen marino. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 2015;35:13-9.
67. Choi H, Kim D, Choi Y, Lee Y, Lee Y-I, Jeong Y, et al. Broad-spectrum *In Vitro* Antimicrobial Activities of *Streptomyces* sp. Strain BCNU 1001. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2012;17:576-83.
68. Peela S, Kurada VB, Terli R. Studies on antagonistic marine actinomycetes from the Bay of Bengal. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2005;21(4):583-5.

69. Gandhimathi R, Arunkumar M, Selvin J, Thangavelu T, Sivaramakrishnan S, Kiran GS, et al. Antimicrobial potential of sponge associated marine actinomycetes. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology*. 2008;18(1):16-22.
70. Bakkiyaraj D, Karutha Pandian ST. In vitro and in vivo antibiofilm activity of a coral associated actinomycete against drug resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Biofouling*. 2010;26(6):711-7.
71. Maskey RP, Li FC, Qin S, Fiebig HH, Laatsch H. Chandrananimycins AC: production of novel anticancer antibiotics from a marine *Actinomadura sp.* isolate M048 by variation of medium composition and growth conditions. *The Journal of antibiotics*. 2003;56(7):622-9.
72. Kokare C, Mahadik K, Kadam S, Chopade B. Isolation, characterization and antimicrobial activity of marine halophilic *Actinopolyspora species AHI* from the west coast of India. *CURRENT SCIENCE-BANGALORE*-. 2004;86(4):593-7.
73. ATCC. ATCC Bacteria Alphanumeric (Genus/Species) 2016 [Available from: https://www.atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Bacteria/Alphanumeric_Genus_Species.aspx].

IX. ANEXOS

Anexo 1 – Certificado

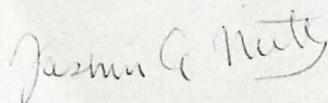
CEPA *STREPTOMYCES SPP.* 6E3

Por la presente, se certifica que la cepa *Streptomyces spp.* 6E3 aislada de minerales en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Universidad Peruana Cayetano Heredia fue caracterizada fenotípicamente con las siguientes características:

1. Características fenotípicas: En agar XGAL y luego de 7 a 10 días de crecimiento a 28°C, las colonias son de color blanco en el borde exterior y plomas en el centro, pulverulentas y en el envés son de color rojizo. Las colonias viejas son de color plomo. Es una bacteria de filamentos delgados, a los 7 a 10 días se observan esporas ovaladas.
2. Condiciones de crecimiento:
 - Temperatura: 28°C
 - Atmósfera: Microaerofilia
3. Condiciones de refrigerado
 - Congelado: a -20°C
 - Refrigerado: de 2°C a 8°C
4. Bioseguridad: la cepa ha sido manejada en un nivel de bioseguridad 1 (Según ATCC para *S. coelicolor*).

Se expide este documento para los fines pertinentes.

Lima, 14 de Diciembre de 2016.



Dra. Jasmin E. Hurtado
Laboratorio Biotecnología Ambiental
LID - Universidad Peruana Cayetano Heredia

Anexo 2 – Información de las cepas indicadoras

Esta información fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC)(73):

- *Escherichiacoli* ATCC 25922
 - Clasificación: Familia Enterobacteriaceae, Genero Escherichia
 - Propiedades Antigénicas: Serotipo 6, Biotipo 1
 - Condiciones de crecimiento: a 37°C en aerobiosis
 - Resistencia antibiótica: Sensible a todos los antibióticos incluyendo beta-lactámicos.

- *Proteusmirabilis* ATCC 12453
 - Clasificación: Familia Enterobacteriaceae, Genero Proteus
 - Propiedades antigénicas: Contiene el antígeno Forssman
 - Condiciones de crecimiento: a 37°C y en aerobiosis
 - Resistencia antibiótica: No mencionada

- *Salmonella typhimurium* ATCC 25241
 - Clasificación: Familia Enterobacteriaceae,, Genero Salmonella
 - Serovariedad: Typhimurium
 - Condiciones de crecimiento: a 37°C en aerobiosis
 - Resistencia antibiótica: No mencionada

- *Shigella sonnei* ATCC 25931
 - Clasificación: Familia Enterobacteriaceae, Genero Shigella
 - Propiedades antigénicas: No mencionada
 - Condiciones de crecimiento: a 37°C en aerobiosis
 - Resistencia antibiótica: No mencionada

- *Staphylococcus aureus* ATCC 33862
 - Clasificación: Familia Staphylococcaceae, Genero Staphylococcus
 - Propiedades antigénicas: No mencionada
 - Condiciones de crecimiento: a 37°C en aerobiosis y microaerofilia
 - Resistencia antibiótica: No mencionada

- *Staphylococcus aureus* ATCC 43300
 - Clasificación: Familia Staphylococcaceae, Genero Staphylococcus
 - Propiedades antigénicas: No mencionada
 - Condiciones de crecimiento: a 37°C en aerobiosis y microaerofilia
 - Resistencia antibiótica: Resistente a Meticilina y Oxacilina

- *Candida albicans* ATCC 90028
 - Clasificación: Familia Saccharomycetaceae, Genero Candida
 - Condiciones de crecimiento: de 30 a 35°C en aerobiosis
 - Resistencia antibiótica: Sensible a Fluconazol

Anexo 3 – Medios de Cultivo

El contenido de los medios, por litro de agua, fue de:

- Medio Extracto de Levadura y Glicerina (XGAL)
 - Glicerol: 5ml
 - Extracto de Levadura: 2 g
 - K₂HPO₄ en polvo: 1g
 - Agar Agar (en caso sea medio solido): 15g

- Medio Mueller Hinton
 - Medio Solido (MHA)
 - Extracto de carne bovina: 2g
 - Hidrolizado acido de caseína: 17.5 g
 - Almidón: 1.5 g
 - Agar-Agar: 13 g

 - Medio Liquido (MHB)
 - Extracto de carne bovina: 2g
 - Hidrolizado acido de caseína: 17.5 g
 - Almidón: 1.5 g

- Caldo Tripticasa de Soya (Especificado por EP, USP, JP)
 - Digerido pancreático de caseína : 15g
 - Digerido papaico de Soya: 5 g
 - Cloruro de Sodio (NaCl): 5g

Anexo 4 – Procedimiento de la Tinción Gram

El procedimiento fue el siguiente:

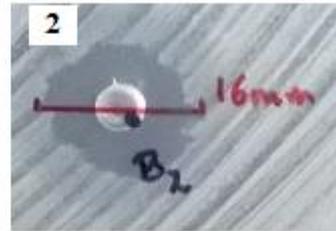
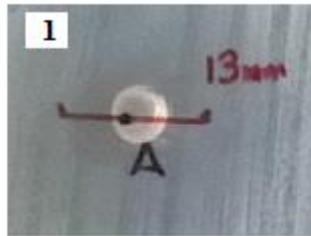
1. Fijación de la muestra

- Con un asa de siembra en forma de lampa, se tomó un poco de la colonia que estaba crecida en el medio XGAL (evitar tomar parte de agar).
- La muestra fue colocada sobre un par de gotas de solución salina previamente puestas sobre una lámina portaobjetos. Se homogeneizó con ayuda del asa y se procedió a secar con ayuda del mechero.

2. Tinción

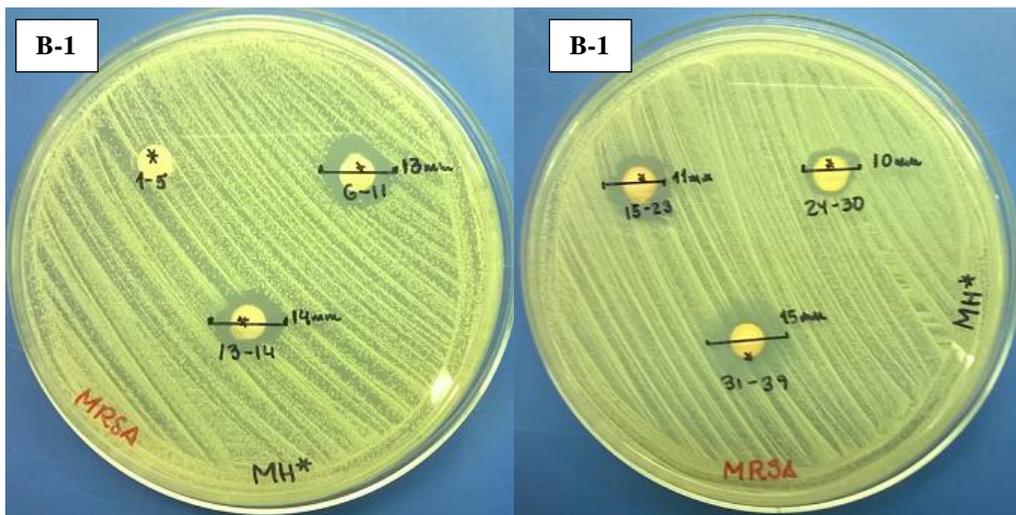
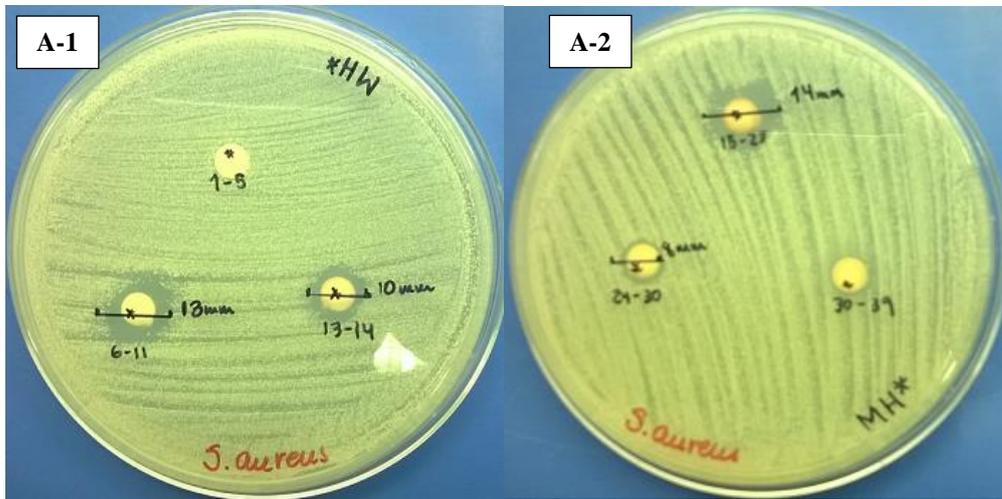
- La lámina fijada fue puesta sobre un puente de tinción y se procedió a poner a cubrir la muestra fijada con los siguientes tintes en el orden que sigue:
 - a. Cristal violeta: dejar reposar por 1 minuto, eliminar y enjuagar la lámina con un chorro de agua.
 - b. Lugol: dejar reposar por 40 segundos, eliminar y enjuagar la lámina con un chorro de agua.
 - c. Alcohol-acetona: lavar la lámina con un chorro o hasta eliminar los residuos de tinte en la muestra fijada y luego enjuagar con agua.
 - d. Safranina: dejar reposar por 1 minuto, eliminar y enjuagar la lámina con un chorro de agua.
- Secar la lámina con ayuda del mechero y dejar enfriar.
- Observar a microscopio a un aumento de 1000x con aceite de inmersión.

Anexo 5 – Fotos de Antibiograma con Extracto bruto



1. Halo de inhibición del extracto frente a *S. aureus* ATCC 33862
2. Halo de inhibición del extracto frente a *S. aureus* ATCC 43300 (Meticilino Resistente)
3. Halo de inhibición del extracto frente a *S. aureus* Cepa Clinica (Meticilino Resistente). Presencia de doble halo, el mayor no fue aceptado por tener bacterias resistentes en medio del mismo.

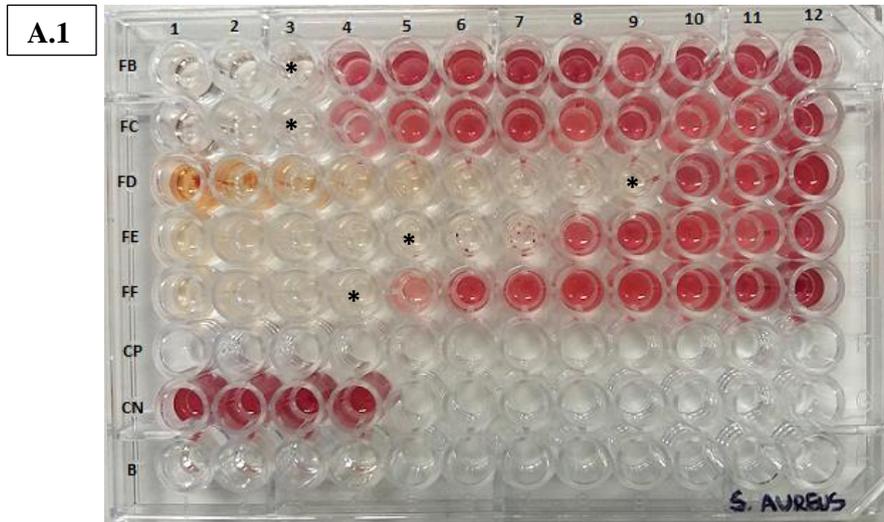
Anexo 6 – Fotos de Antibiograma con Fracciones



- *S. aureus* ATCC 33862 (**A-1** y **A-2**) y *S. aureus* ATCC 43300 Meticilino Resistente (**B-1** y **B-2**) frente a las fracciones:
 - 1 – 5 : Fracción A
 - 6 – 11: Fracción B
 - 13-14: Fracción C
 - 15-23: Fracción D
 - 24-30: Fracción E
 - 31-39: Fracción F

Anexo 7 – Fotos de Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y Esquemas de concentraciones.

- *S. aureus* ATCC 33862



A.2

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-----------|-----|-------|----------|------------|------|------------|------|------|-------------|------|------|-------|
| FB | 32 | 16.3 | 8 | 4 | 2 | 1 | 0.5 | 0.25 | 0.125 | 0.06 | 0.03 | 0.015 |
| FC | 32 | 16.3 | 8 | 4 | 2 | 1 | 0.5 | 0.25 | 0.125 | 0.06 | 0.03 | 0.015 |
| FD | 225 | 112.5 | 56.3 | 28.1 | 14.1 | 7.05 | 3.5 | 1.76 | 0.88 | 0.44 | 0.22 | 0.11 |
| FE | 70 | 35 | 17.5 | 8.8 | 4.4 | 2.2 | 1.1 | 0.55 | 0.27 | 0.14 | 0.07 | 0.035 |
| FF | 70 | 35 | 17.5 | 8.8 | 4.4 | 2.2 | 1.1 | 0.55 | 0.27 | 0.14 | 0.07 | 0.035 |
| CP | 120 | 60 | 30 | 15 | 7.8 | 3.75 | 1.88 | 0.98 | 0.47 | 0.23 | 0.12 | 0.06 |
| CN | | | | | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | | | |

Fotografía de la MIC realizada a la cepa *S. aureus* ATCC 33862(A.1) y esquema de las concentraciones (en ug/ml) en la microplaca(A.2)

FB – FF: Fracciones B, C, D, E y F.

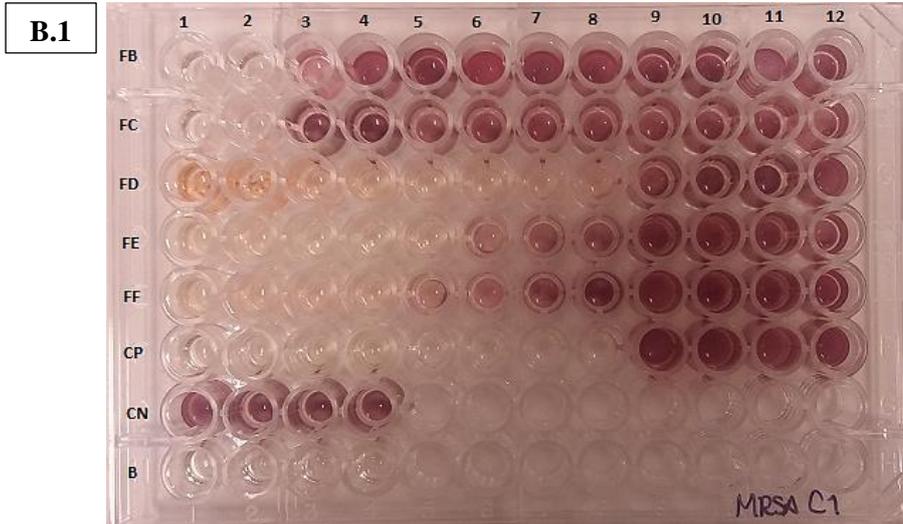
CP: Control positivo (CMI de penicilina frente a cepa indicador)

CN: Control negativo (Caldo Mueller Hinton con cepa indicador)

B: Blanco (Caldo Mueller-Hinton)

* La CMI de cada fracción y del control positivo, está señalada en rojo en la tabla del esquema de concentraciones y con asteriscos en la imagen.

- *S. aureus* Cepa Clínica – Meticilino Resistente



B.2

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-----------|------|-------------|------|-------------|------------|------|------|-------------|-------|------|------|-------|
| FB | 32.5 | 16.3 | 8 | 4 | 2 | 1 | 0.5 | 0.25 | 0.125 | 0.06 | 0.03 | 0.015 |
| FC | 32.5 | 16.3 | 8 | 4 | 2 | 1 | 0.5 | 0.25 | 0.125 | 0.06 | 0.03 | 0.015 |
| FD | 225 | 112.5 | 56.3 | 28.1 | 14.1 | 7.05 | 3.5 | 1.76 | 0.88 | 0.44 | 0.22 | 0.11 |
| FE | 70 | 35 | 17.5 | 8.75 | 4.4 | 2.2 | 1.1 | 0.55 | 0.27 | 0.44 | 0.07 | 0.035 |
| FF | 70 | 35 | 17.5 | 8.75 | 4.4 | 2.2 | 1.1 | 0.55 | 0.27 | 0.14 | 0.07 | 0.035 |
| CP | 120 | 60 | 30 | 15 | 7.8 | 3.75 | 1.88 | 0.98 | 0.47 | 0.23 | 0.12 | 0.06 |
| CN | | | | | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | | | |

Fotografía de la MIC realizada a la cepa *S. aureus* Cepa Clínica(**B.1**) y esquema de las concentraciones (en ug/ml) en la microplaca(**B.2**)

FB – FF: Fracciones B, C, D, E y F.

CP: Control positivo (CMI de vancomicina frente a cepa indicador)

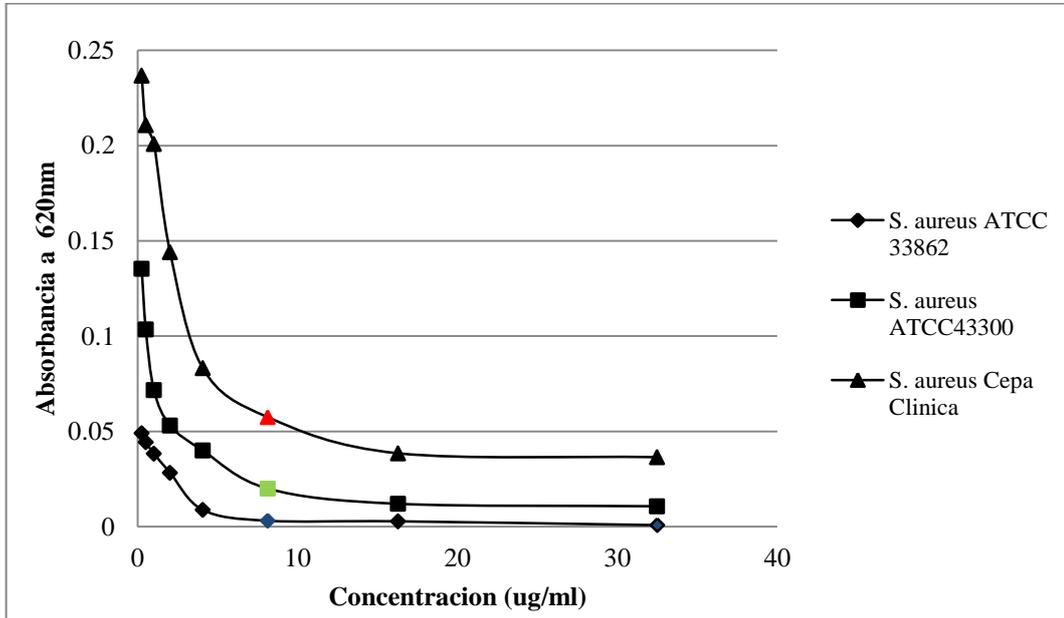
CN: Control negativo (Caldo Mueller Hinton con cepa indicador)

B: Blanco (Caldo Mueller-Hinton)

* La CMI de cada fracción y del control positivo, está señalada en rojo en la tabla del esquema de concentraciones y con asteriscos en la imagen.

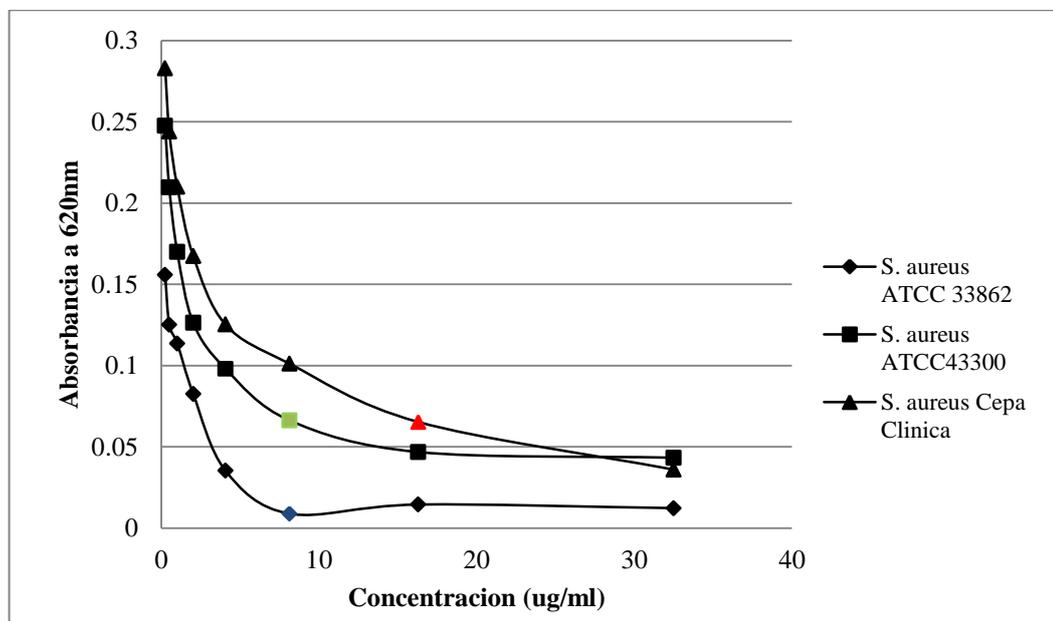
Anexo 8 – Tabla de Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de las Fracciones

- **Fracción B**



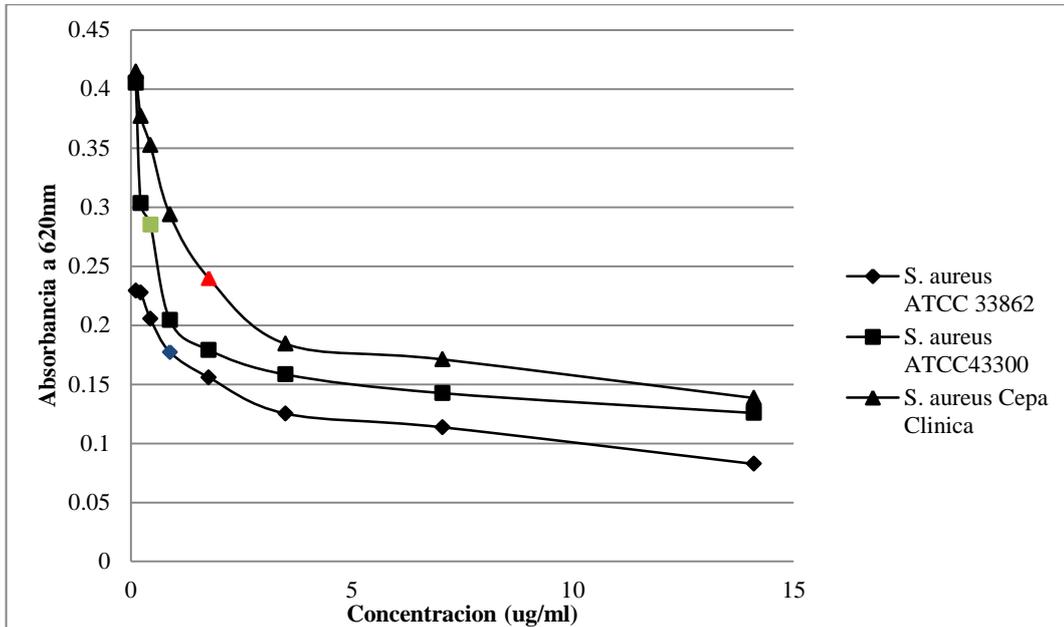
Curva hecha con las concentraciones en el rango de 32.5ug/ml a 0.25ug/ml

- **Fracción C**



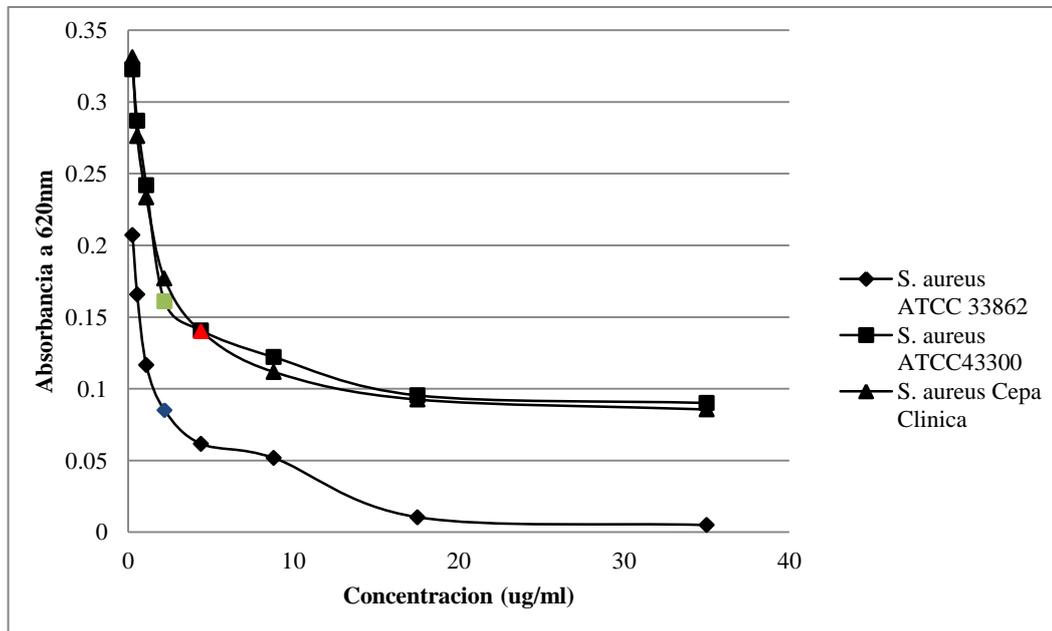
Curva hecha con las concentraciones en el rango de 32.5ug/ml a 0.25ug/ml

- **Fracción D**



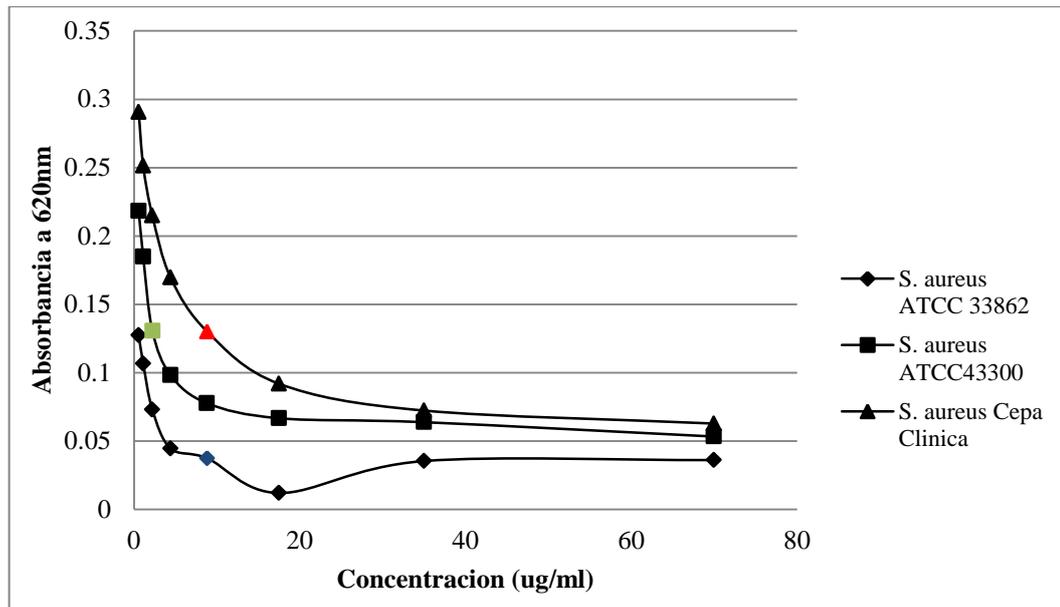
Curva hecha con las concentraciones en el rango de 14.1 ug/ml a 0.11 ug/ml.

- **Fracción E**



Curva hecha con las concentraciones en el rango de 35 ug/ml a 0.27 ug/ml

- **Fracción F**



Curva hecha con las concentraciones en el rango de 70 ug/ml a 0.55 ug/ml