

# ANALISIS DE LA PRESENCIA DE LOS COMPLEJOS ENZIMATICOS PKSI, PKSII Y NRPS POR PCR Y/O ENFRENTAMIENTO DIRECTO EN ACTINOBACTERIAS AISLADAS DEL RIO ARAUCA

LUIS EDUARDO DIAZ BARRERA

PhD en Ciencias Químicas

Asesor Externo - Universidad de La Sabana

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

TRABAJO DE GRADO

BOGOTÁ D.C. 2018

Estefanyha Hernández Duarte

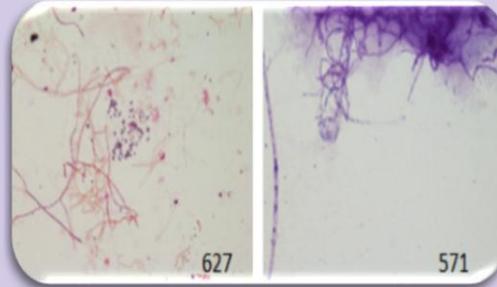


# ACTINOBACTERIAS



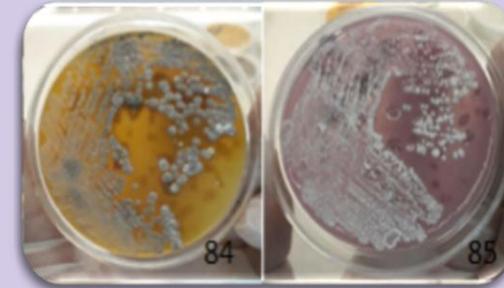
## TAXONOMIA

- Dominio: Bacteria
- Filo: Actinobacteria
- Clase: Actinobacteria
- Genero: *Streptomyces*



## Familia: *Streptomycetaceae*

- *Streptomyces*: es el género mas grande de las actinobacterias
- Habitan principalmente en la tierra, agua, hielo, zonas áridas.
- Produce mayor número de antibióticos tanto como bactericidas, fungicidas y otros compuestos bioactivos como inmunosupresores y anticancerígenos
- El género *Streptomyces* se caracteriza por poseer un metabolismo secundario complejo (rutas metabólicas no requeridas para la supervivencia )



## CARACTERISTICAS

- Segundo grupo de bacterias Gram positivas mas grande
- Alto contenido de G-C
- Bacilos gram positivos, morfología similar a hifas de hongos
- Degradadoras de materia
- Olor a tierra húmeda

Estefanyha Hernández Duarte



# POLICETIDOS

Productos naturales

Comprenden

Polifenoles

Macrólidos

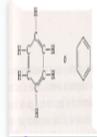
Polienos

Poliéteres

Prostaglandinas



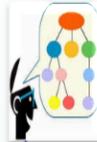
Farmacológico



Estructuralmente



Producidos a partir de



Sintetizado

Papel  
biológico

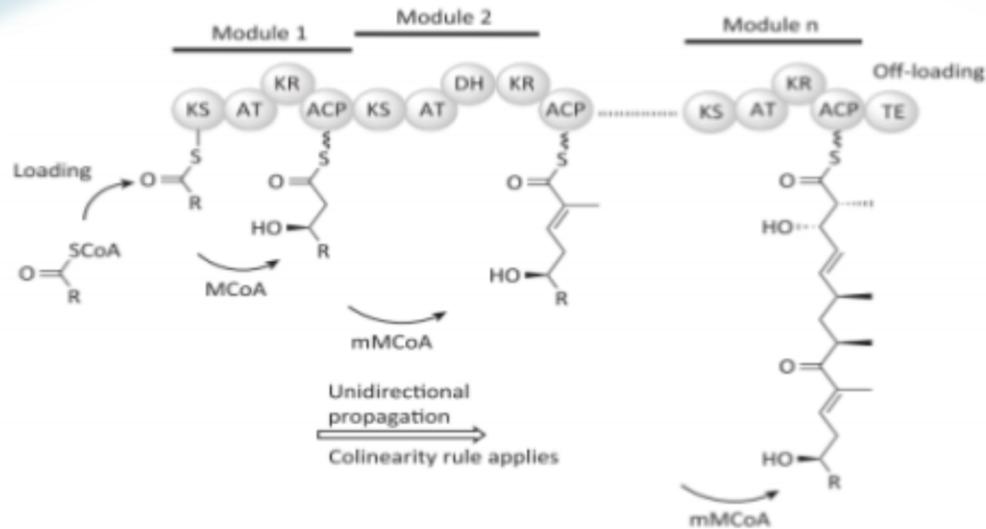
Se cree  
que  
funcionan

-Pigmentos  
-Factores de  
virulencia  
-Defensa  
-Infoquímicos

Estefanyha Hernández Duarte



# BIOSÍNTESIS DE POLICÉTIDOS TIPO PKS I Y PKS II



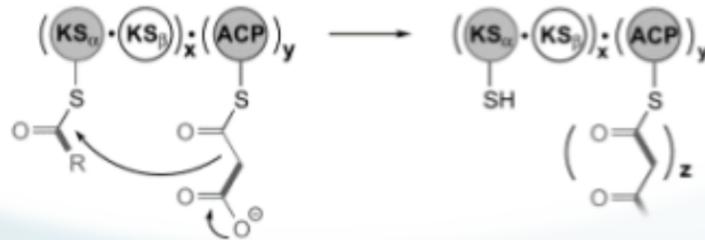
## PKS I

- Por módulos siempre lineal
- 2 dominios catalíticos **AT** Y **KS**, y 1 dominio **ACP**
- Organizados en forma *Cis*

## PKS II

- No siempre en forma lineal
- 2 dominios **KS $\alpha$**  y **KS $\beta$** , y 1 dominio **ACP**
- Organizado en forma *Trans*

## b) PKSII



organización modular del complejo PKS I Y PKS II aciltransferasa (AT), cetosintasa (KS) y ACP (proteína transportadora de grupos acilo) Fuente: a) PKS I (Shen, 2003), b) PKS II (Hertweck, 2015).

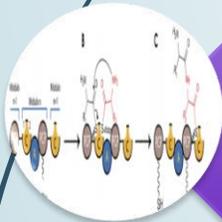
# PÉPTIDOS NO RIBOSOMALES



Biocatalizadores modulares



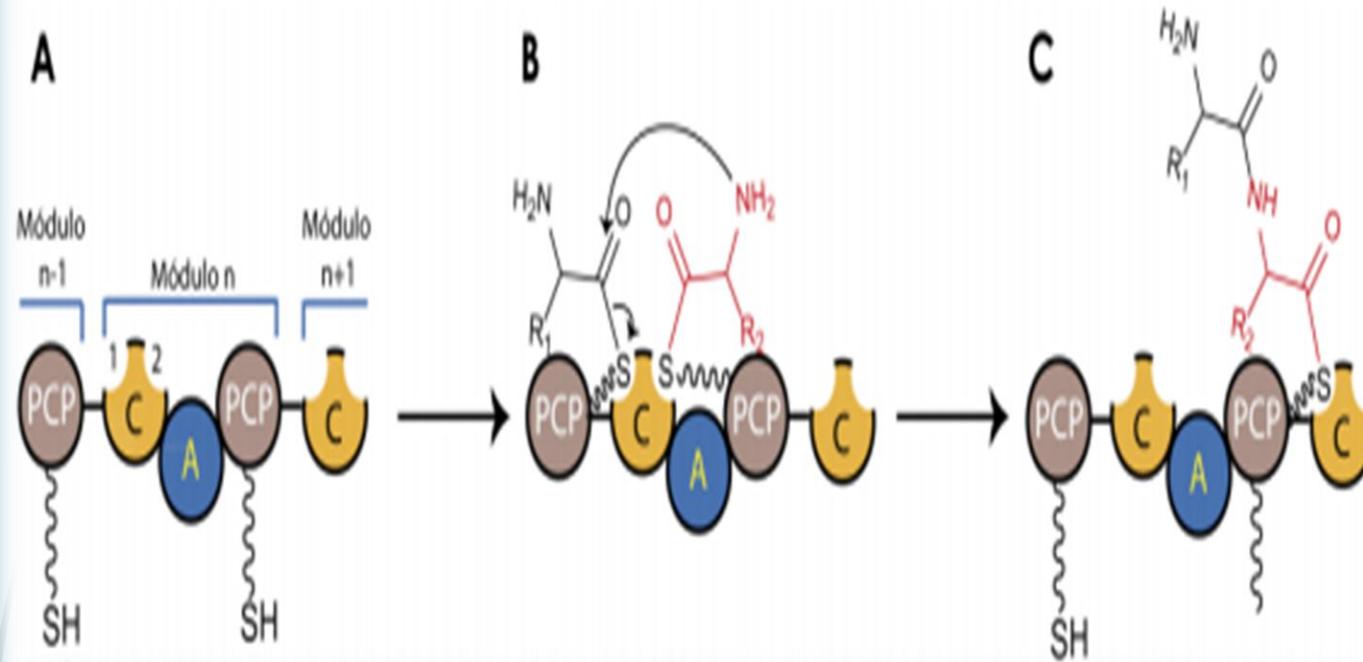
Formados por



Estructuralmente



# BIOSÍNTESIS DE PÉPTIDOS NO RIBOSOMALES



## NRPS

- Módulos repetitivos en forma lineal
- Dominio de **A**, **C** (catalítico) y un dominio **PCP**
- Organizado en dominios ubicuos

Funcionamiento de un módulo prototipo de una NRPS. A | Representación mínima de un módulo NPRS con un dominio C y un dominio PCP. B | Incorporación de la nueva molécula (rojo) a la cadena que proviene de hipotéticos módulos anteriores (negro). C | El dominio PCP cede la cadena para que ocurra el siguiente paso de condensación. Modificado de Finking y Marahiel (2004)

Estefanyha Hernández Duarte



# ANTECEDENTES

Ayuso A. et al 2005

Da Cruz Pedro L. et al 2015

PKS Y NRPS

Fischbach M.A. et al 2006

Lee L-H. et al 2014

Barrios-Llerena M. E. et al 2007

Meier J.L. y Burkat M.D. 2011

Estefanyha Hernández Duarte



# PROBLEMA

Grupo de investigación de bioprospección de La Universidad de La Sabana

Estudio para la identificación de nuevos antibióticos



<https://tecnacol.net/preguntas-frecuentes>

700 aislados



[data:image/jpeg;base64,google.com](https://data:image/jpeg;base64,google.com)



<https://es.slideshare.net/amppp/limites-de-venezuela>

# OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL

Establecer la presencia de los complejos enzimáticos PKS I, PKS II y NRPS mediante PCR en Actinobacterias aisladas del río Arauca y compararla con los resultados de una técnica microbiológica.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener cultivos axénicos de *Actinobacterias* aisladas del río Arauca para su identificación morfológica y molecular
2. Determinar la presencia de los sistemas PKS I, PKS II y/o NRPS mediante la amplificación de algunos genes que codifican enzimas específicas de estos sistemas
3. Comparar la actividad antimicrobiana de *Actinobacterias frente a* bacterias Gram Positivas y Gram negativas mediante enfrentamiento directo con respecto a los resultados de la técnica molecular (PCR)

# TIPO DE ESTUDIO

## *Tipo de investigación*

- Estudio de tipo Experimental

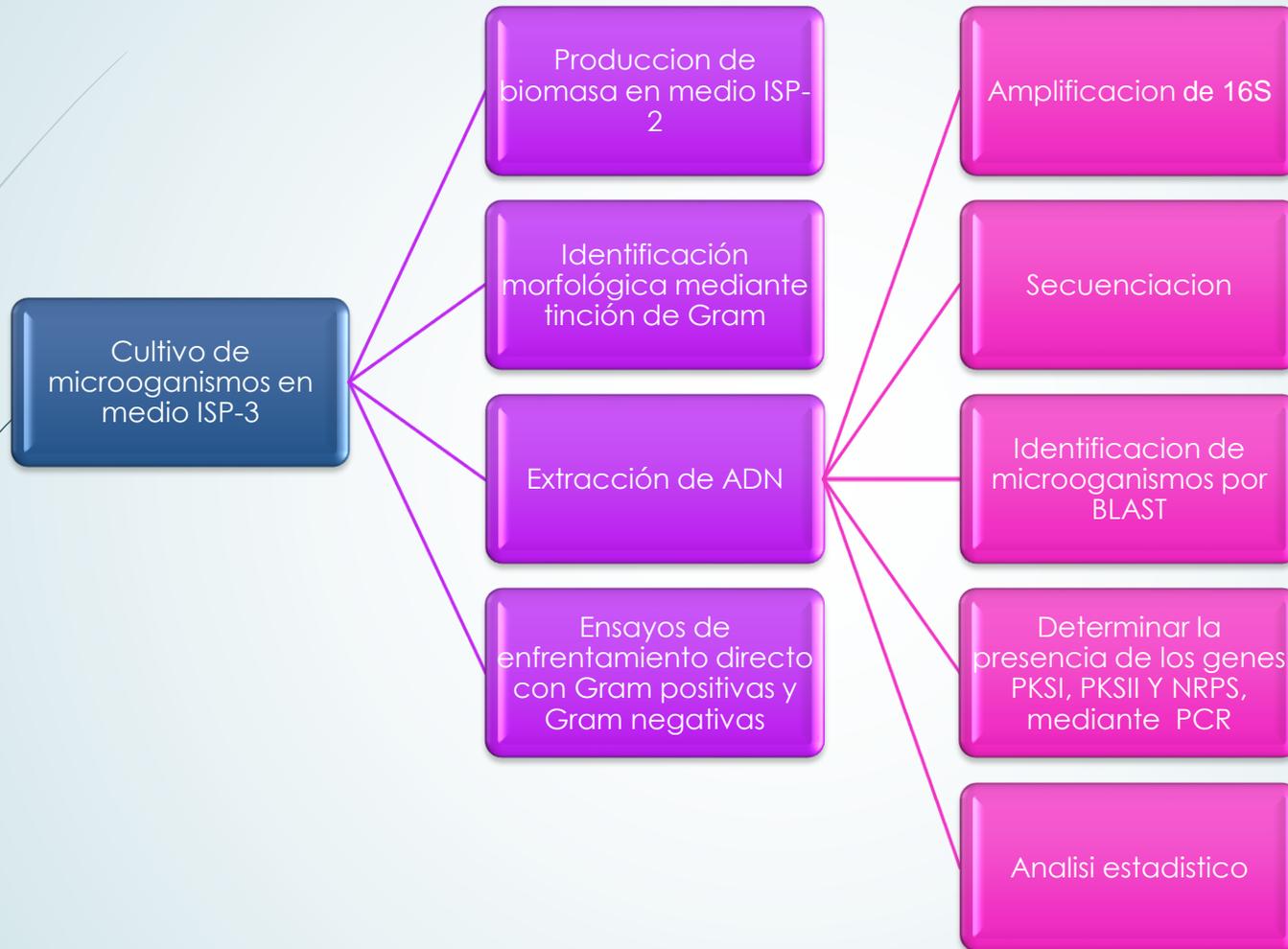
## *Población*

- Actinomicetos extraídos del Rio Arauca

## *Muestra*

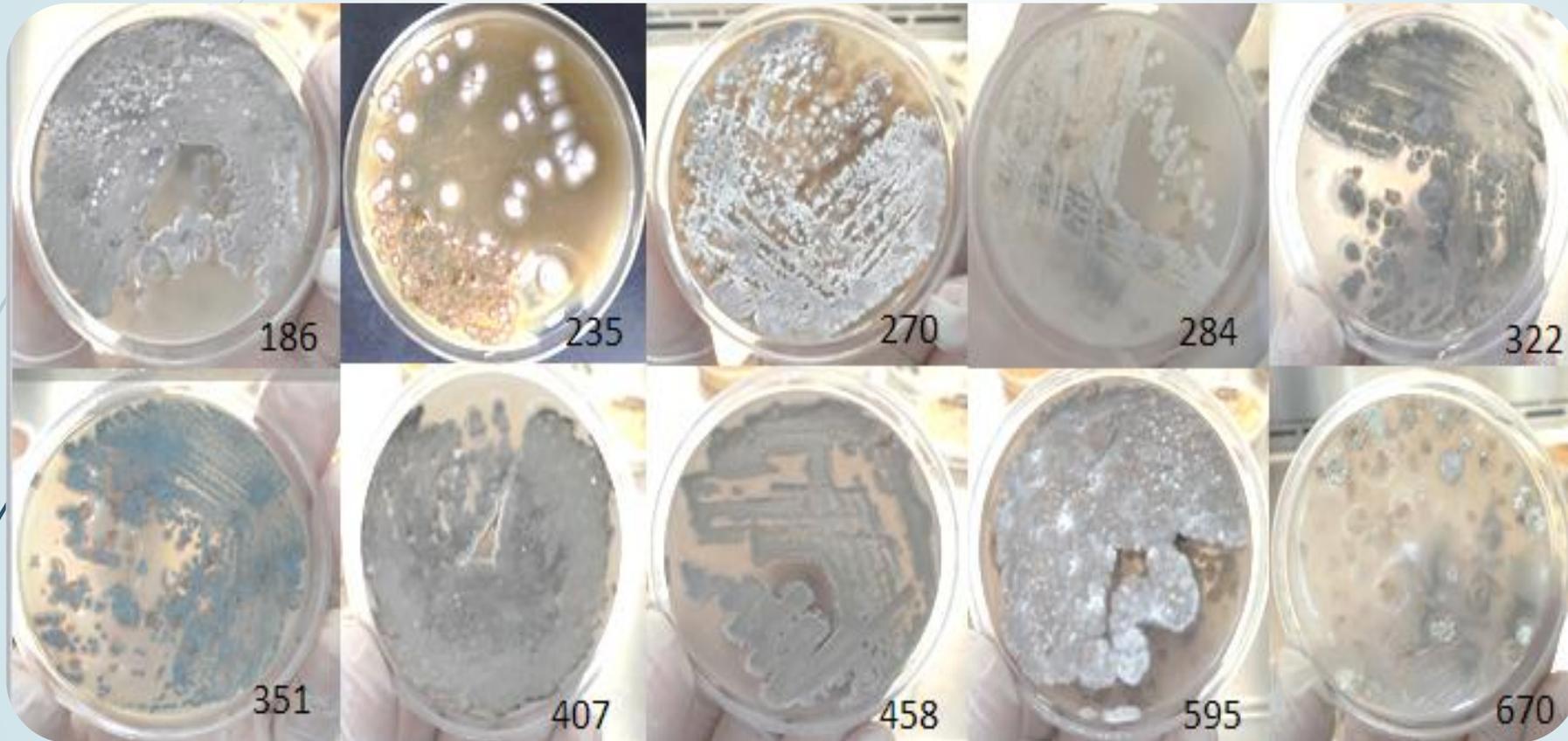
- Se escogieron 30 cepas por conveniencia, no probabilística, tomadas del banco de microorganismos de la Universidad de La Sabana previamente aisladas de la ribera del río Arauca.

# METODOLOGIA



# RESULTADOS

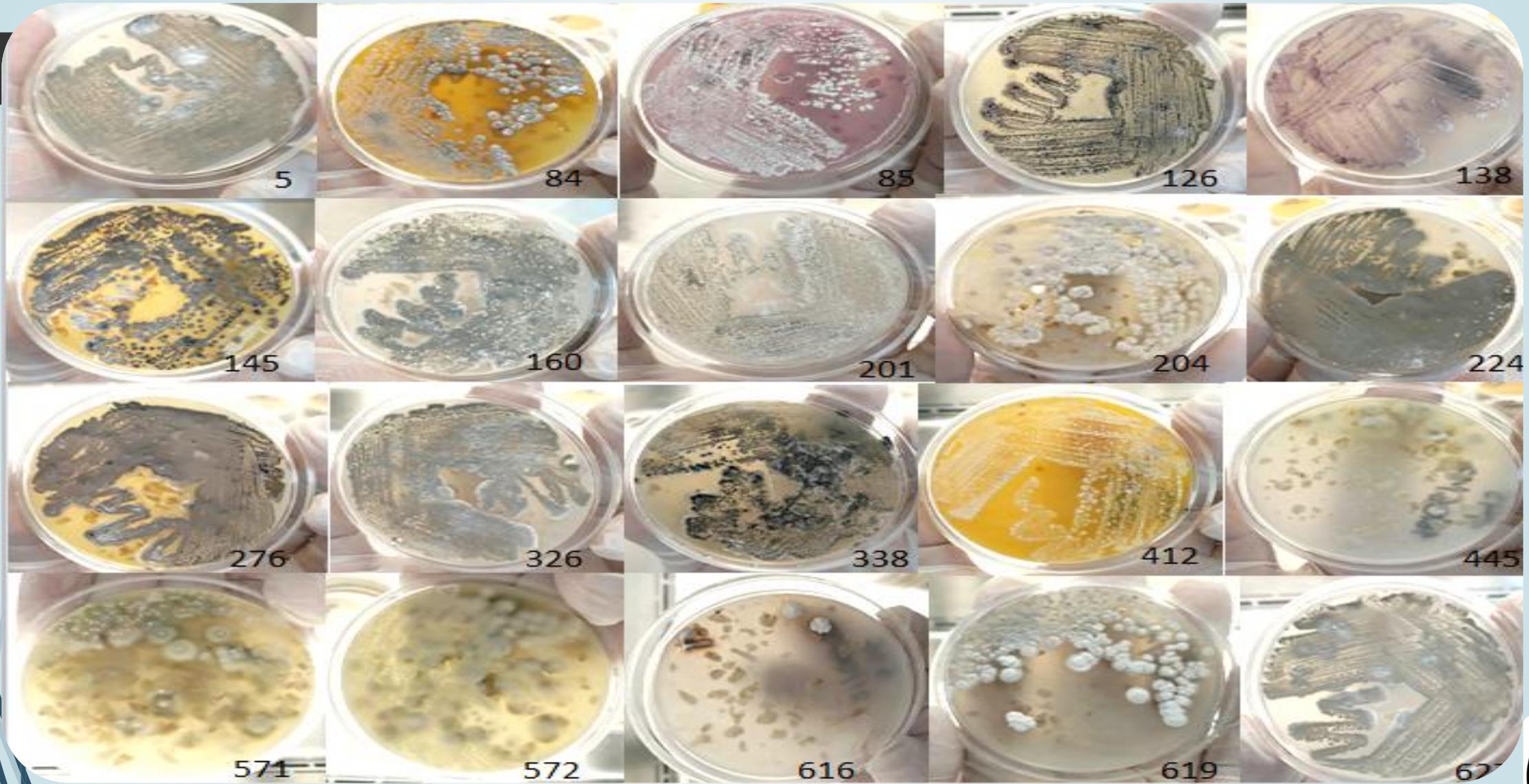
## ACTIVACION DE ACTINOMICETOS MEDIO ISP-3



Agar ISP-3 las cepas durante 7 días a 30°C

Estefanyha Hernández Duarte





5

84

85

126

138

145

160

201

204

224

276

326

338

412

445

571

572

616

619

621

Estefanyha Hernández Duarte

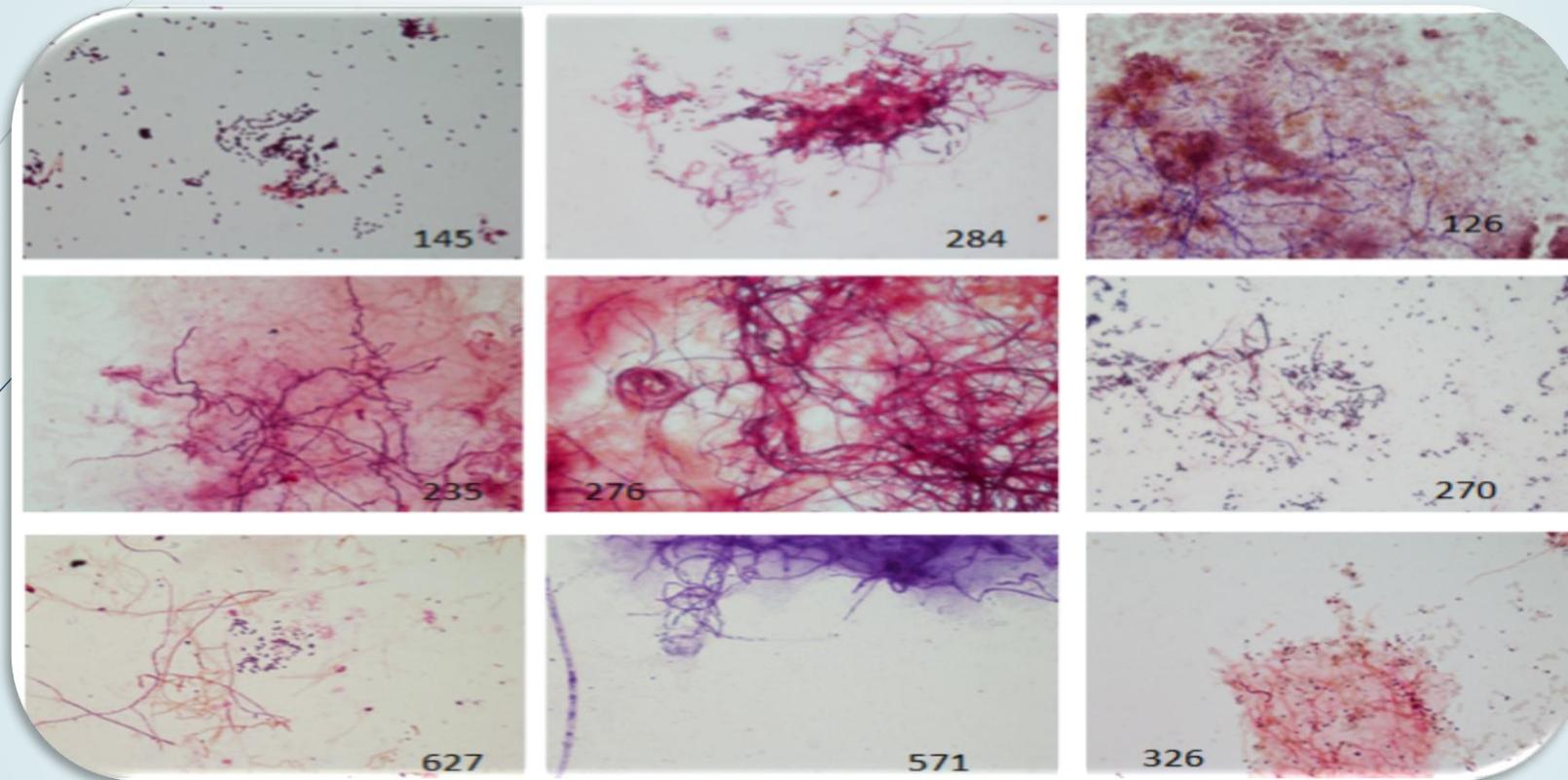


## ► PRODUCCION DE BIOMASA ISP-2



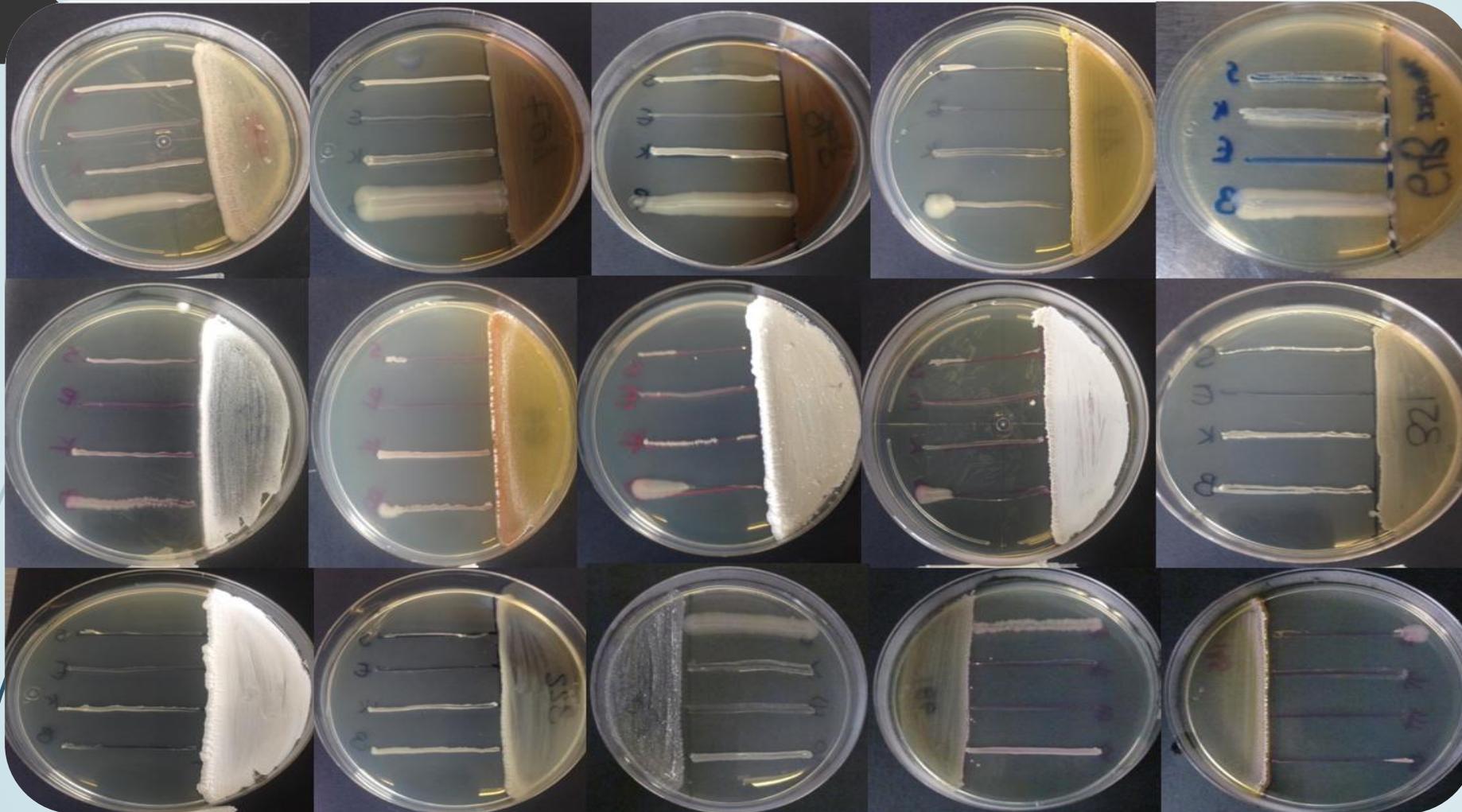
con 10 ml de medio ISP-2, se incubó con agitación constante (250 rpm) a 30 °C durante 7 días.

## ► IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA



*características microscópicas de actinobacterias. , Tinción de Gram de algunas de las cepas aisladas y observadas en el objetivo de 100x. Fuente: Autora*

## ► ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA



El Método de prueba de un organismo para su espectro de actividad antibiótico.  
Autor: T. D. Brock, tomado de commercial products and Biotechnology 2009.

Cultivado sobre agar Mueller Hinton, sembrado masivo incubados a 30°C durante 7 días.

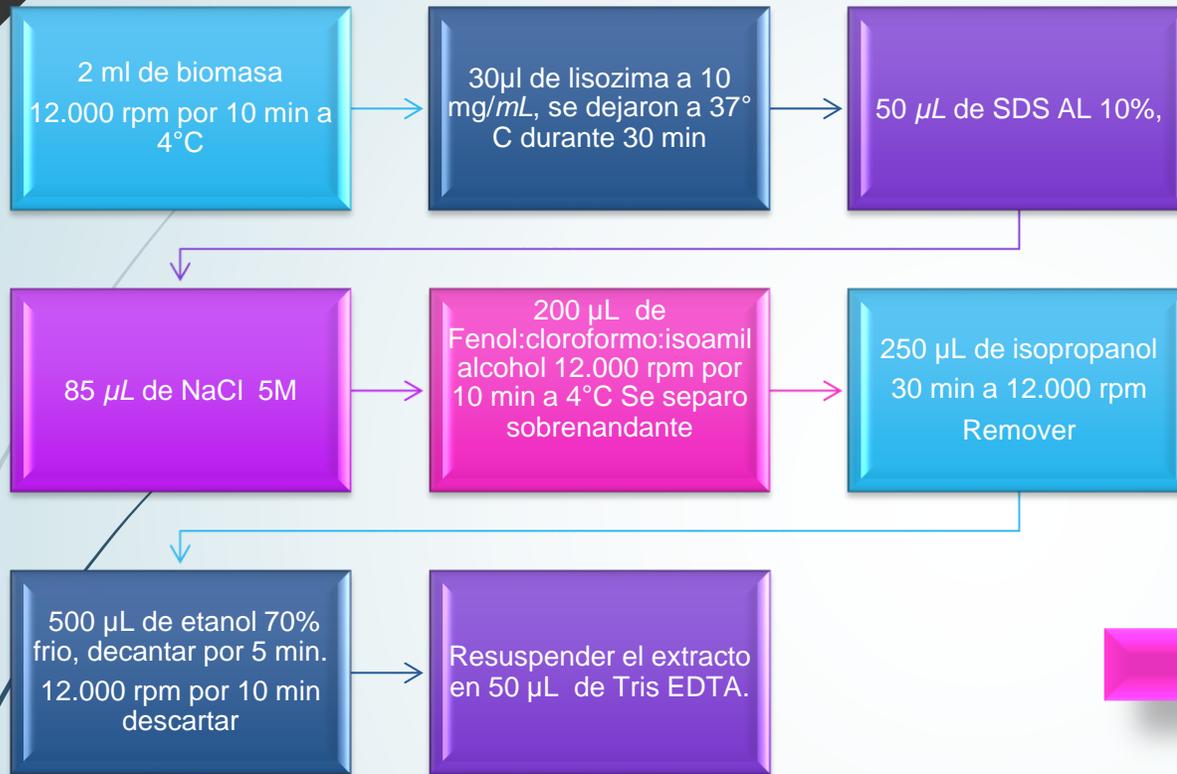
Siembra de manera perpendicular a 3 mm de distancia de con las siguientes bacterias: *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina MRSA (ATCC BAA-44), *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina VRE-(ATCC 700221) y *Bacillus subtilis* (ATCC 21556)

Incubadas a 37 °C durante 24 h

Estefanyha Hernández Duarte

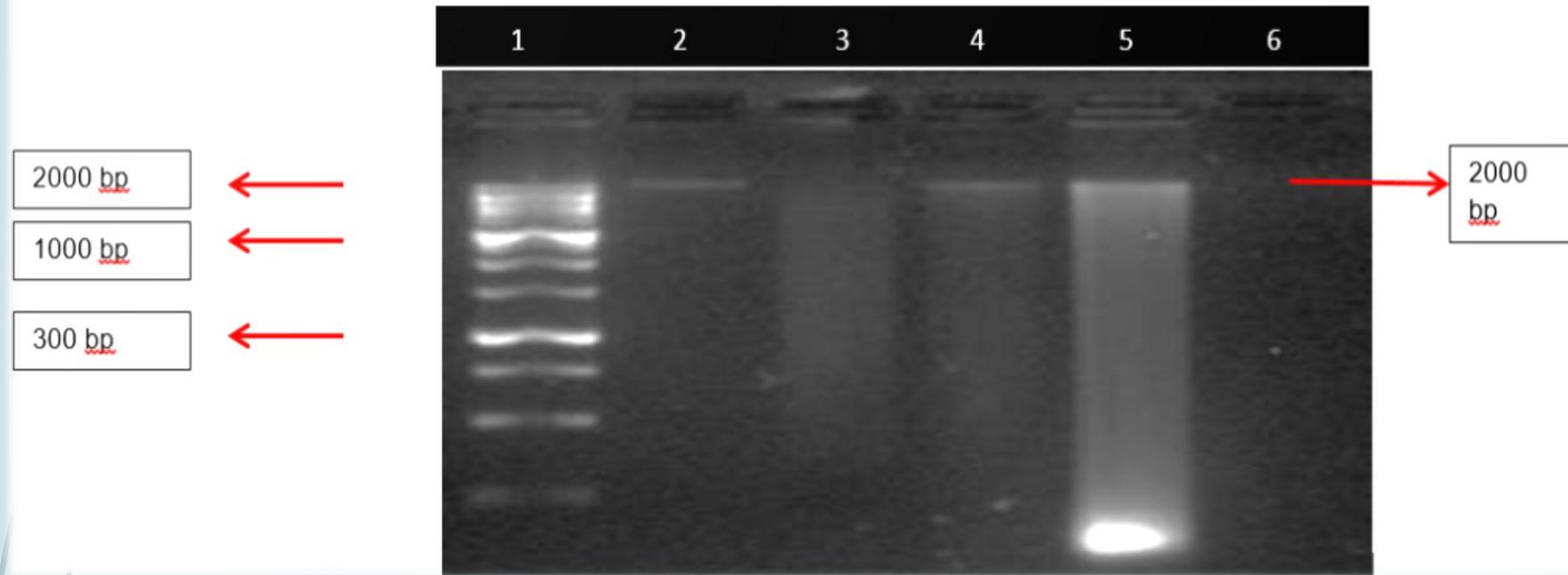


## ➤ EXTRACCION DE ADN



El ADN genómico total extraído se examinó mediante una electroforesis 1% (w/v) gel de agarosa

## Extracción de ADN



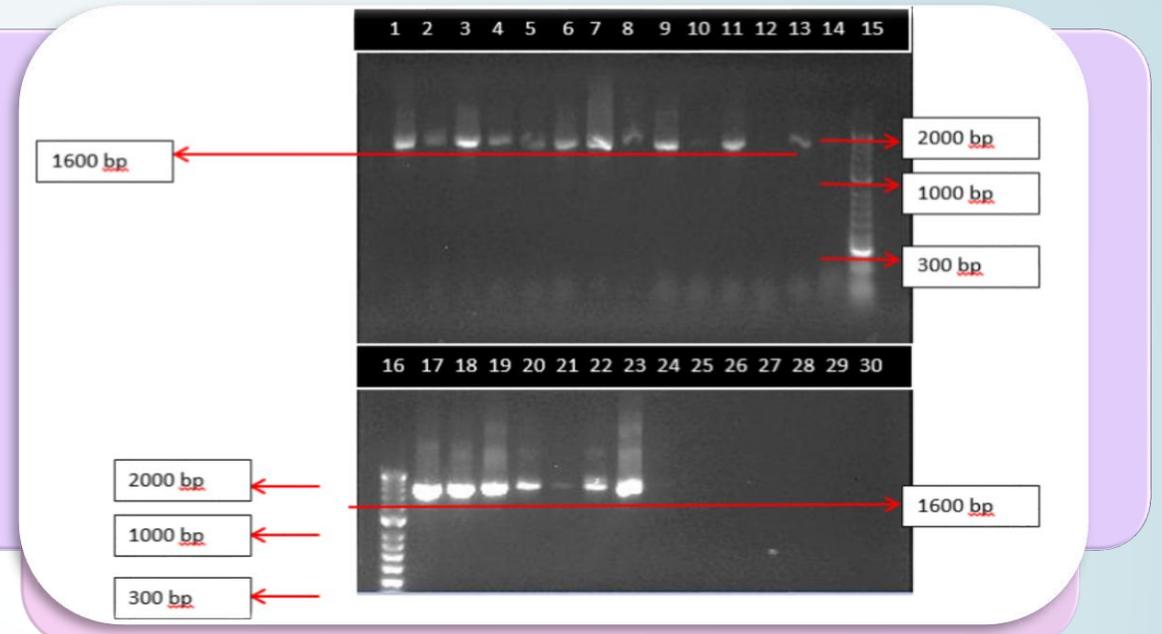
Gel de agarosa 1% (w/v) con algunas de las muestras de Actinobacterias después de la extracción ADN de los cultivos por lisis celular, pozo 1: marcador de peso molecular Hyperladder II/ lane, pozo 2: aislado 619 ADN total, pozo 3: aislado 571 ADN total, pozo 4: aislado 572 ADN total, pozo 5: aislado 616 ADN total, pozo 6: aislado 627 ADN total

## ► Amplificación del gen 16S rRNA

Programa de Amplificación	Tiempo	Temperatura (°C)
<b>Desnaturalización inicial</b>	3 min	95
<b>Desnaturalización (30 ciclos)</b>	45s	95
<b>Anillamiento</b>	1 min	54
<b>Extensión</b>	1:30 min	72
<b>Extensión final</b>	5 min	72

Programa PCR para la amplificación del gen 16S rRNA Fuente: Protocolo [bioted bioted.es/protocolos/PCR-GEN-16S-ARNr-BACTERIANO.pdf](http://bioted.bioted.es/protocolos/PCR-GEN-16S-ARNr-BACTERIANO.pdf)

Se amplificó el gen 16S rRNA a partir del ADN extraído usando los oligonucleótidos 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') y 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3') con una reacción de PCR en un volumen de 13 µL,



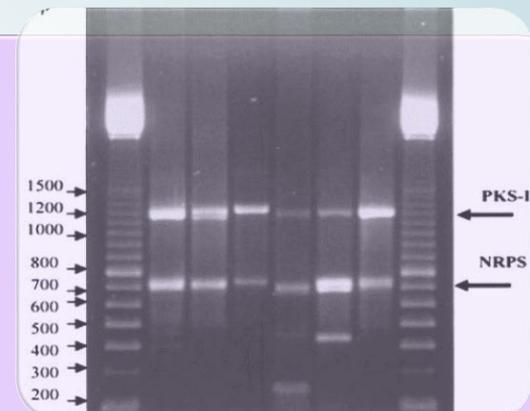
Gel de agarosa 1% (w/v) amplificación de la región 16s, pozo 1: aislado 186, pozo 2: aislado 235, pozo 3: aislado 270, pozo 4: aislado 284 pozo 5: aislado 322 pozo 6: aislado 351 pozo 7: aislado 407 pozo 8: aislado 458, pozo 9: aislado 595, pozo 10: aislado 670, pozo 11: aislado 619, pozo 12: aislado 5 pozo 13: aislado 84, pozo 14: aislado 85, pozo 15: marcador Hyperladder II /lane. pozo 16: marcador Hyperladder II /lane, pozo 17: aislado 204 pozo 18: aislado 224 pozo 19: aislado 338 pozo 20: aislado 412 pozo 21: aislado 445, pozo 22: aislado 571 pozo 23: aislado 627 pozo 24, control de reactivos 25,26,27,28,29 y 30 no se realizó siembra.



## IDENTIFICACIÓN Y PRESENCIA DE GENES MEDIANTE PCR

Gen	Primer	Secuencia (5'-3')	Tamaño del producto (pb)
PKS I	K1F	TSA AGT CSA ACA TCG GBC A	1200-1400
	M6R	CGC AGG TTS CSG TAC CAG TA	
PKS II	KS $\alpha$	TSG CST GCT TGG AYG CSA TC	600
	KS $\beta$	TGG AAN CCG CCG AAB CCT CT	
NRPS	A3F	GCS TAC SYS ATS TAC ACS TCS GG	700-800
	A7R	SAS GTC VCC SGT SCG GTA S	

Proceso		Tiempo (min)	Temperatura (°C)	
Desnaturalización inicial		5	94	
(30 ciclos)	Desnaturalización	1	94	
	Anillamiento	PKS-I	1	57
		PKS-II	1	57
NRPS		1	62	
Extensión		2	72	
Extensión final		5	72	



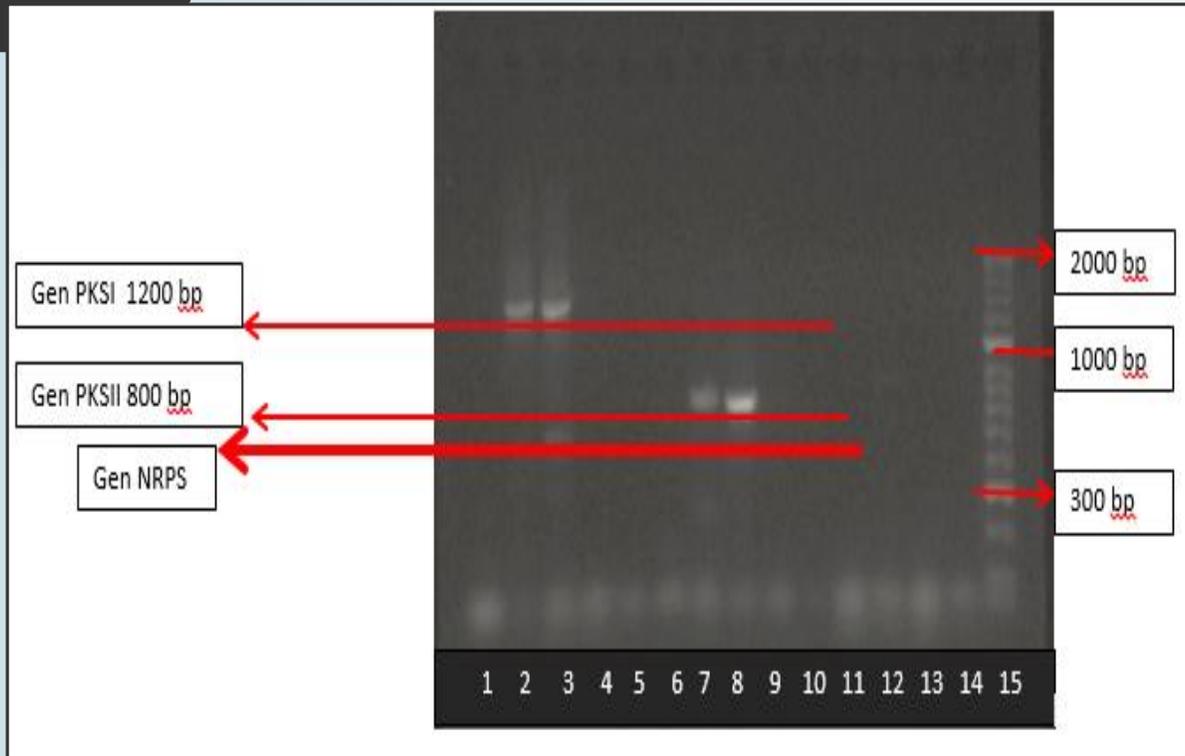
De los productos de PCR aislado de los actinomicetos Fuente: A. Ayuso-Sacido and O. Genilloud(2003)

Primers utilizados para la amplificación de los genes que codifican antibióticos en los complejos enzimáticos PKS I, PKS II y NRPS

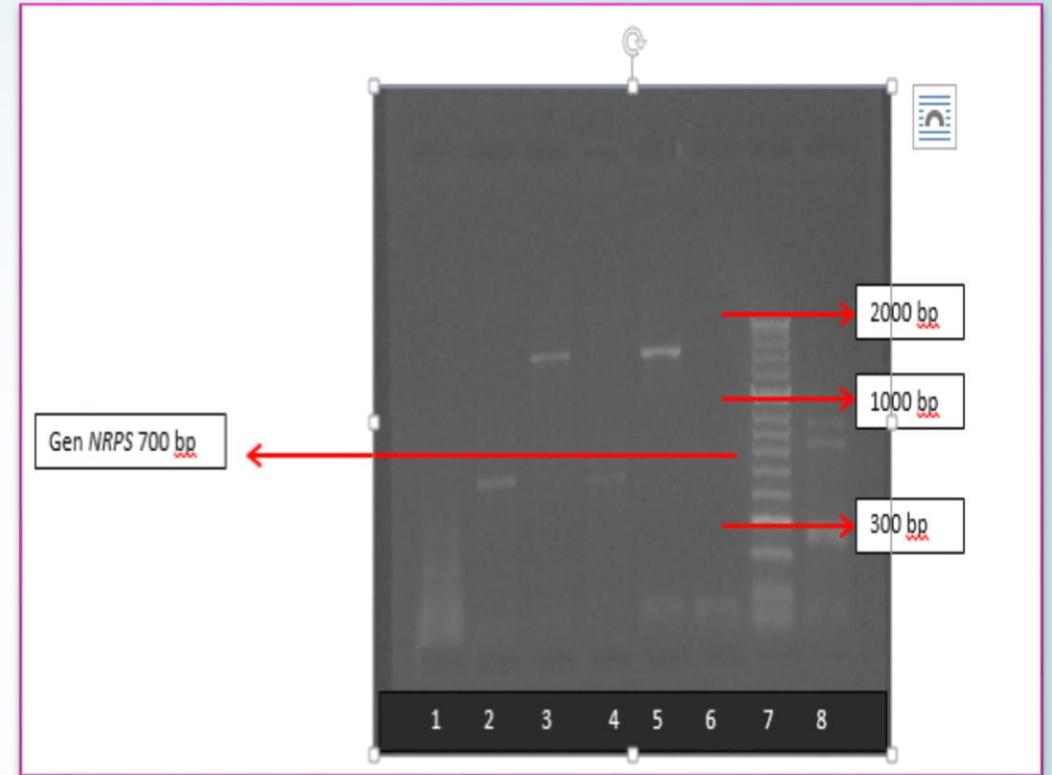
Programa PCR para la amplificación de los genes que codifican antibióticos en los complejos enzimáticos PKS I, PKS II y NRPS (Lee et al., 2014)

La reacción de PCR se confirmó mediante electroforesis (1X TBE, agarosa al 1.0%, 1.0 $\mu$ l de SYBR® safe DNA gel stain) y se utilizó el marcador de peso molecular Hyperladder II/lane, 1.5%.

## ► SCREENING DE PCR

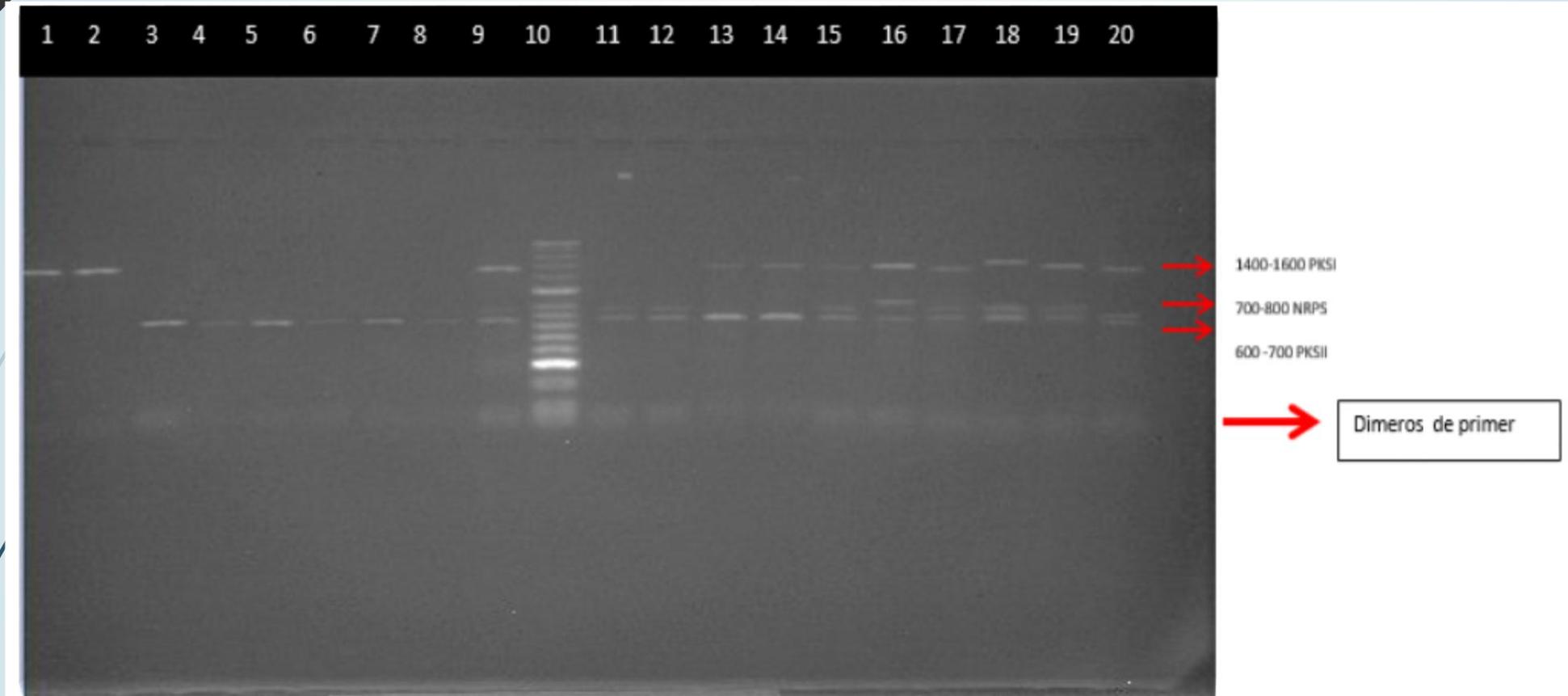


Gel de agarosa Prueba piloto para la detección de los genes PKS I, PKS II Y NRPS, Pozo 2: muestra 627 PKS I, pozo 3: 445 PKS I, pozo 5: control reactivos PKS I, pozo 7: 627 PKS II, pozo 8: 445 PKS II, pozo 10: control reactivos PKS II, pozo 12: 627 NRPS, pozo 13: 445 NRPS, pozo 14: control reactivos NRPS, pozo 15: marcador de peso molecular Hyperladder II /lane



Gel de agarosa prueba piloto para la detección de los genes PKS I, PKS II Y NRPS, pozo 1: vacío, pozo 2: 445 PKS II, pozo 3: 160 PKS I, pozo 4: 160 PKS II, pozo 5: 284 PKS I, pozo 6: control de reactivos, pozo 7: marcador de peso molecular Hyperladder II /lane, pozo 8: 627 NRPS

## ► GENES EXPRESADOS EN PCR



Gel de agarosa amplicones para los genes PKS I, PKS II Y NRPS pozo 1: cepa 5 PKS I, pozo 2: cepa 284 PKS I, pozo 3: cepa 126 PKS II, pozo 4: cepa 145 PKS II, pozo 5: cepa 186 PKS II, pozo 6: cepa 224 PKS II, pozo 7: cepa 235 PKS II, pozo 8: cepa 276 PKS II, pozo 9: control positivo Streptomyces coelicolor, pozo 10: Hyperladder II/lane Bioline, pozo 11: cepa 85 PKS II-NRPS, pozo 12: cepa 458 PKS II-NRPS, pozo 13: cepa 571 PKS I-PKS II, pozo 14: cepa 572 PKS I-PKS II, pozo 15: cepa 160 PKS I-PKS II-NRPS, pozo 16: cepa 270 PKS I-PKS II-NRPS, pozo 17: cepa 326 PKS I-PKS II-NRPS, pozo 18: cepa 412 PKS I-PKS II-NRPS, pozo 19: cepa 445 PKS I-PKS II-NRPS, pozo 20: cepa 627 PKS I-PKS II-NRPS.

## ► ANALISIS ESTADISTICO

Porcentajes De Presencia del Gen En 30 Cepas De Estudio

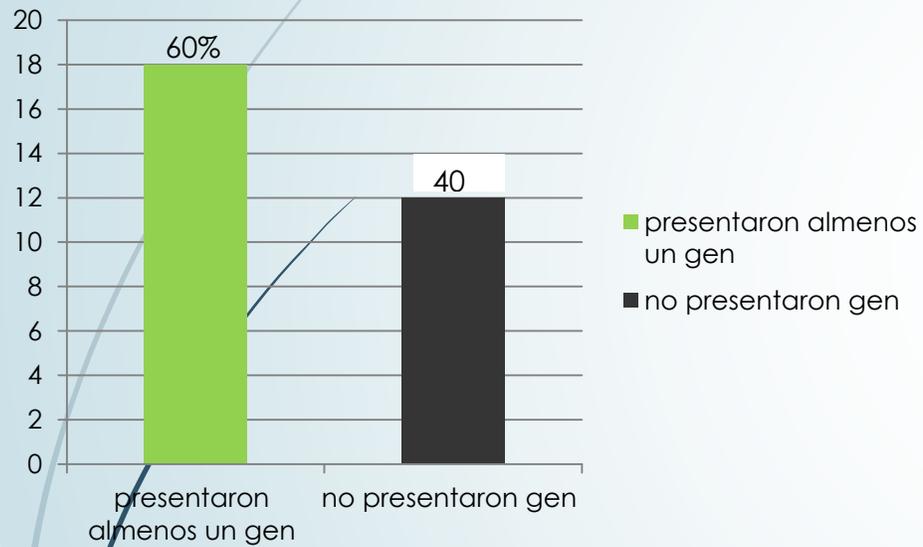
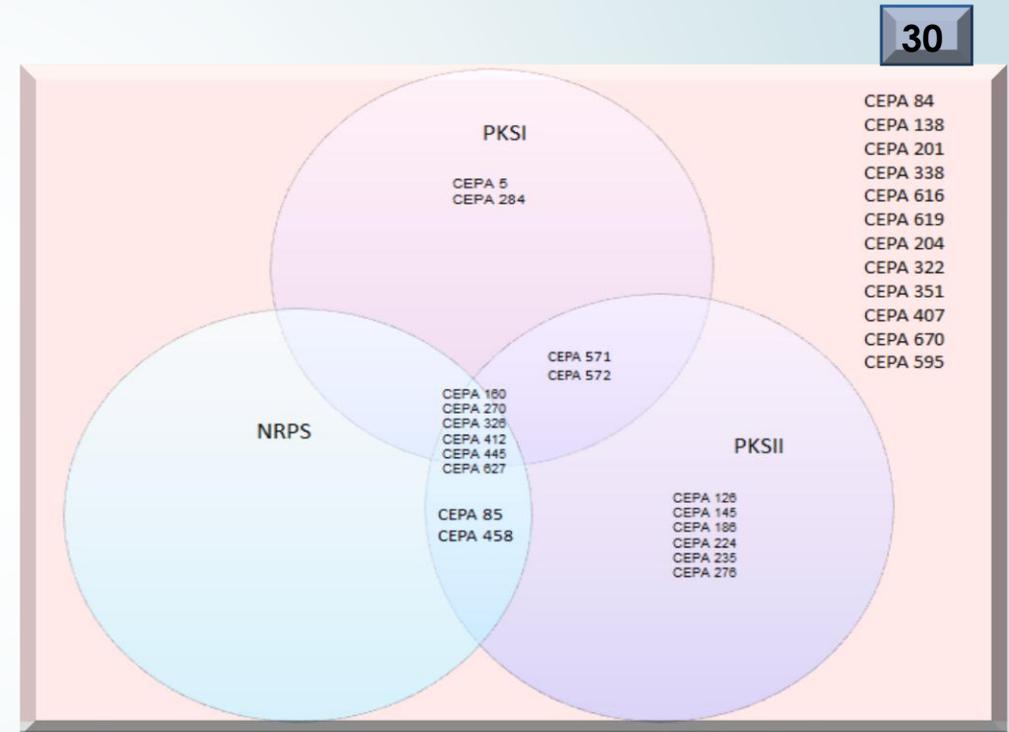


Diagrama de Venn para la clasificación de las 30 cepas De Estudio

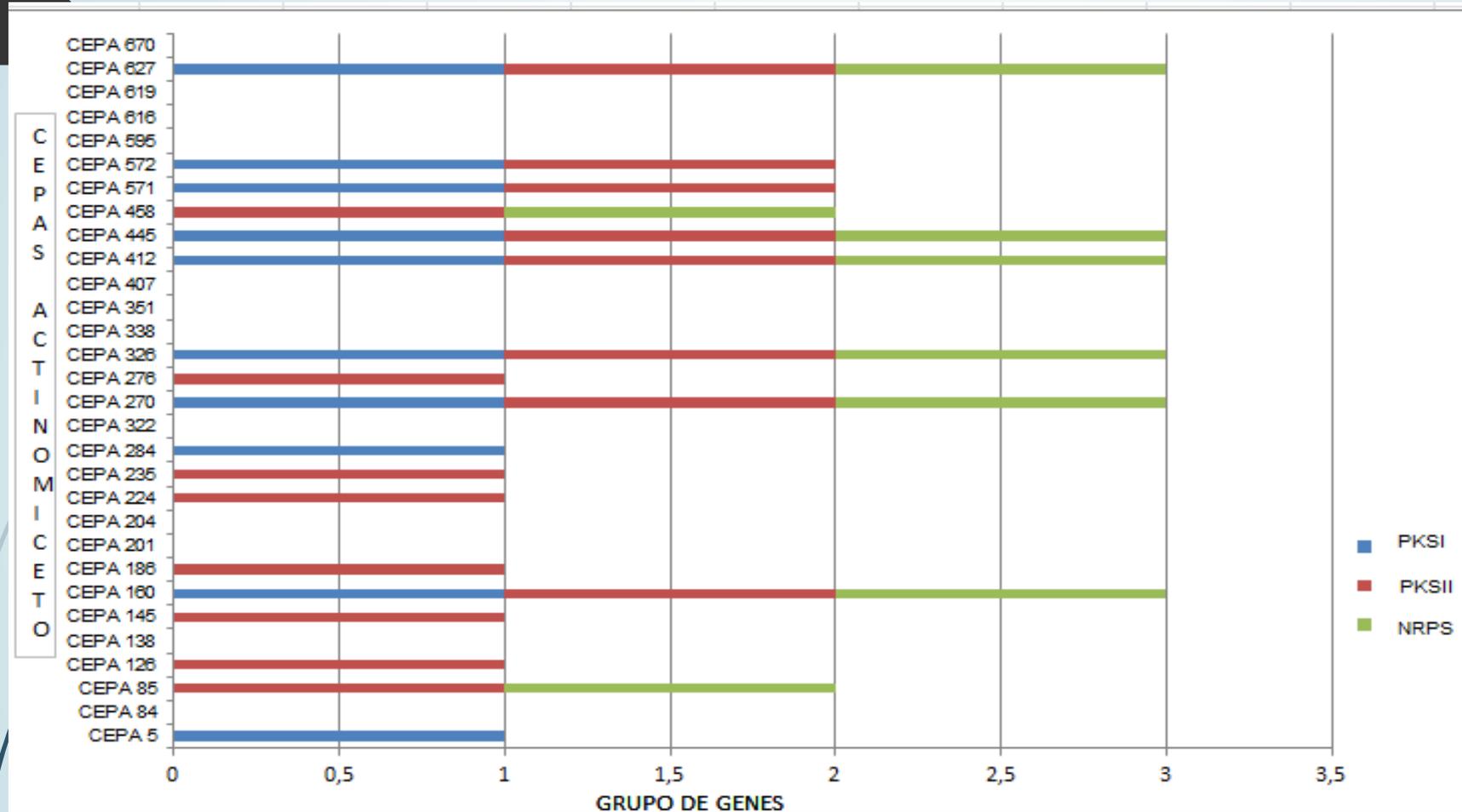


## ► Interpretación de datos por técnica de enfrentamiento directo



Esta figura nos muestra las Cepas que por técnica de enfrentamiento directo se observó que hicieron inhibición a alguno de los microorganismos de prueba como son *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina MRSA (ATCC BAA-44), *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina VRE-(ATCC 700221), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), y *Bacillus subtilis* (ATCC 21556), así :19 cepas, inhibieron el crecimiento de *B. subtilis*, 17 cepas, inhibieron el crecimiento de *S. aureus*, 9 cepas, inhibieron el crecimiento de *E. faecium* y 7 cepas, inhibieron el crecimiento de *K. pneumoniae*

## ► Interpretación de datos presencia de los genes PKS I, PKS II Y NRPS en PCR



En esta gráfica se evidenció la presencia de los genes PKS I, PKS II y NRPS en PCR, mostrando que en 10 cepas se presentó el gen PKS I, así mismo que para el gen PKS II se evidenció su presencia en 16 cepas y finalmente NRPS se observó en 8 cepas, destacando que en 6 cepas se presenta más de un gen.

Estefanyha Hernández Duarte



## Interpretación de resultados de las técnicas PCR y Enfrentamiento directo

Cepa	Nombre	Enfrentamiento Directo positivo				Resultado PCR		
		MRSA Gram Positivo	VRE Gram Positivo	K.pneumoniae Gram Negativo	B. subtilis Gram Positivo	PKSI	PKSII	NRPS
5	<i>Streptomyces.albonipus</i>	✓	✓		✓	✓		
84	<i>Streptomyces sp.</i>			✓	✓			
85	<i>Streptomyces sp.</i>	✓		✓	✓		✓	✓
126	<i>Streptomyces sp.</i>	✓	✓		✓		✓	
138	<i>Streptomyces sp. NEAU-JF7</i>	✓		✓	✓			
145	<i>Streptomyces sp. X3-5</i>	✓	✓	✓	✓		✓	
160	<i>Streptomyces sp.</i>	✓			✓	✓	✓	✓
201	<i>Streptomyces sp.</i>	✓		✓	✓			
204	<i>Streptomyces sp.</i>	✓			✓			
224	<i>Streptomyces sp. Strain AB2</i>	✓	✓	✓	✓		✓	
276	<i>Streptomyces sp.</i>		✓		✓		✓	
326	<i>Streptomyces sp.</i>	✓	✓		✓	✓	✓	✓
338	<i>Streptomyces sp.</i>		✓					
412	<i>Streptomyces sp. parvulus</i>	✓		✓	✓	✓	✓	✓
445	<i>Streptomyces sp.</i>	✓			✓	✓	✓	✓
571	<i>Streptomyces sp.</i>	✓			✓	✓	✓	
572	<i>Streptomyces luteireticuli strain NRRL B-12435</i>	✓			✓	✓	✓	
616	<i>Streptomyces lunalinharesii strain 235</i>	✓	✓		✓			
619	<i>Streptomyces sp. 769</i>	✓			✓			
627	<i>Streptomyces sp. CB01388</i>	✓	✓		✓	✓	✓	✓
186	<i>Streptomyces sp, sirex AA-E</i>						✓	
235	<i>Streptomyces sp.</i>						✓	
270	<i>Streptomyces sp. TY53-2</i>					✓	✓	✓
284	<i>Streptomyces sp.</i>					✓		
322	<i>Streptomyces sp.</i>							
351	<i>Streptomyces sp.</i>							
407	<i>Streptomyces sp. AUNIA-2</i>							
458	<i>Streptomyces sp. Strain. AC 12</i>						✓	✓

# Comparación de la actividad antimicrobiana por Enfrentamiento directo vs técnica PCR

		PCR		Total
		Positivo	Negativo	
Enfrentamiento Directo Positivo	Positivo	13	7	20
		65,0	35,0	100,0
		72,2	58,3	66,7
	Negativo	5	5	10
		50,0	50,0	100,0
		27,8	41,7	33,3
Total	18	12	30	
		60,0	40,0	100,0

Test de Fisher: 0,46

Interpretación: no hay diferencia entre las dos técnicas en identificar la actividad antimicrobiana en las cepas estudiadas

Análisis estadístico: se construyó una tabla de 2X2 con los resultados positivos y negativos de cada una de las dos técnicas; Enfrentamiento Directo Positivo y PCR. Se aplicó la el test de Fisher, porque hay una casilla con un valor esperado inferior a 5, para establecer la diferencia de proporciones en los metabolitos secundarios. Se considera un valor significativo una  $p \leq 0,05$

Se utilizó el programa estadístico SPSS versión 17,0



# CONCLUSIONES

Realizar las técnicas de manera complementaria debido a que cada una de aporta resultados de manera independiente, la realización de la prueba solo por enfrentamiento directo podría llegar a concluir falsos negativos debido a que al no tener el espectro de patógenos completos en cuanto las rutas de síntesis o las condiciones necesarias

la PCR se vuelve útil para salvar cepas que inicialmente se descartaron como negativas, de esta manera se debe corroborar este estudio con un tamaño de muestra más grande para este hallazgo importante.

En la muestra analizada en esta investigación se determinó la presencia de los genes biosintéticos PKS I-PKS II Y NRPS de las cepas aisladas de la ribera del río Arauca, permitiendo identificar la presencia y la producción de metabolitos secundarios y que sean estas sean propuestas como una herramienta de complementación de los diagnósticos tradicionales.

# RECOMENDACIONES

- ▶ Se sugiere un mayor tamaño de muestra debido a que se escogió por conveniencia y no de manera aleatoria por los costos que se podrían generar, y no permitió observar diferencia estadística en el estudio, debido a la capacidad y proporción de captar la presencia de agentes antimicrobianos en las 2 técnicas siendo igual, se necesitarían más muestras para corroborar los valores de pruebas, pero si dar un avance que por medio de este hallazgo se puede dar fiabilidad a las técnicas usadas y que pueden ser complementadas.
- ▶ Ampliar los sistemas de rutas conocidos recientemente con sus respectivos primer, de igual manera el número de microorganismos a evaluar.
- ▶ Mejorar pautas en cada una de las técnicas.

# AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, por brindarnos una formación académica integral, al grupo de docentes quienes día a día fortalecieron nuestros conocimientos
- A la Universidad de la Sabana, por brindarnos sus instalaciones, cuerpo de administrativos y docentes para nuestro servicio, en especial al PhD Luis Eduardo Díaz Barrera por brindarme su experiencia, por enseñarme a valorar mi trabajo y a salir adelante a pesar de las adversidades



# BIBLIOGRAFIA

- Ayuso-Sacido A., and Genilloud O., "New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups.," *Microb. Ecol.*, vol. 49, no. 1, pp. 10–24, Jan.2005
- González I., Ayuso-Sacido A., Anderson A., , and Genilloud O., "Actinomycetes isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic genesequences.," *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 54, no. 3, pp. 401–15, Nov. 2005.
- Barrios-Llerena M. E., Burja A. M, and Wright P. C., "Genetic analysis of polyketide synthase and peptide synthetase genes in cyanobacteria as a mining tool for secondary metabolites.," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 34, no. 6, pp. 443–56, Jun. 2007.
- Ayuso A., Clark D., González I., Salazar O., Anderson A., and Genilloud, O. "A novel actinomycete strain de-replication approach based on the diversity of polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase biosynthetic pathways.," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 67, no. 6, pp. 795–806, Jun. 2005.
- Hwang K.-S., Kim H. U, Charusanti P., Palsson B. Ø., and Lee S. Y., "Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites.," *Biotechnol. Adv.*, vol. 32, no. 2, pp. 255–68, 2014.
- Lee L.-H., Zainal N., Azman A.-S., Eng S.-K., Goh B.-H, Yin W.-F., Ab Mutalib N.-S., and Chan K.-G., "Diversity and antimicrobial activities of actinobacteria isolated from tropical mangrove sediments in Malaysia.," *ScientificWorldJournal.*, vol. 2014, p. 698178, Jan. 2014.
- Williams G. J., "Engineering polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases.," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 23, no. 4, pp. 603–12, Aug. 2013.
- Fischbach M. a and Walsh C. T, "Assembly-line enzymology for polyketide andnonribosomal Peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms.," *Chem. Rev.*,vol. 106, no. 8, pp. 3468–96, Aug. 2006.
- Quiñones-Aguilar E. E. et al. Los actinomicetos y su aplicación biotecnológica. *Elementos* 101 (2016) 59-64
- Evangelista-Martínez Z y Moreno-Enríquez A (2007). Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos. *Revista BioTecnología* 11:37-50.
- Genilloud O, González I, Salazar O, Martín J, Tormo JR and Vicente F (2011). Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 38:375-389.

- Hatano K, Nishii T, Kasai H. "Taxonomic re-evaluation of whorl-forming *Streptomyces* (formerly *Streptoverticillium*) species by using phenotypes, DNA-DNA hybridization and sequences of *gyrB*, and proposal of *Streptomyces luteireticuli* (ex Kato and Arai 1957) corrig., sp. nov., nom. rev." **Int J Syst Evol Microbiol.** 2003 Sep; 53 (Pt 5): 1519-29.
- Kumar Y. and Goodfellow M., "Reclassification of *Streptomyces hygrosopicus* strains as *Streptomyces aldersoniae* sp . nov ., *Streptomyces angustmyceticus* sp . nov ., comb . nov ., *Streptomyces ascomycinicus* sp . nov .," no. 2010, pp. 769–775, 2017
- <https://prezi.com/svcrbo2ot5yi/extraccion-de-adn/>
- <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis13.pdf>
- [https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/457/1/PCB\\_BT\\_D\\_Tesis\\_2017\\_Marfil\\_Miguel.pdf](https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/457/1/PCB_BT_D_Tesis_2017_Marfil_Miguel.pdf)
- Pastrana N. C., "Evaluación de la actividad antibacterial y antifúngica de actinobacterias cultivables aisladas de las riberas del río guaviare," 2015.
- Da Cruz Pedro L. et al , "Triagem Metabólica Por Pks E Nrps Em Actinobactérias Endofíticas De Citrus Reticulata" *Quim. Nova*, Vol. 38, No. 3, 333-341, 2015
- Nett M., Ikeda H., and Moore B. S, "Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes.," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 26, no. 11, pp. 1362–84, Nov.2009.
- Weber T., Charusanti P., Musiol-Kroll E. M., Jiang X., Tong Y., Kim H. U, and Lee S. Y., "Metabolic engineering of antibiotic factories: new tools for antibiotic production in actinomycetes," *Trends Biotechnol.*, vol. 33, no. 1, pp. 15–26, Dec. 2014.
- En Wink, J., en Mohammadipannah, F., y en Ham, J. (2017). *Biología y biotecnología de actinobacterias*
- Izquierdo R. M, Tom S y Read.G.A. Reacción En Cadena De La Polimerasa (PCR), <http://cosmolinux.no-ip.org/uned/pcr.pdf>
- Nikaido, H., y Vaara, M. (1985). Base molecular de la permeabilidad bacteriana de la membrana externa. *Microbiological Reviews* , 49 (1), 1-32.
- Sharma M (2014) Actinomycetes: source, identification and their applications. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3: 801-832.
- Perez N.M. "Evaluación De La Actividad Antimicrobiana Y Citotóxica De Metabolitos Secundarios Producidos Por Actinomicetos Aislados De Suelos Colombianos" PUJ.2010
- Vanek Z, Majer J. 1967. Macrolide antibiotics. In *Antibiotics II. Biosynthesis*. New York: Springer- Verlag.

GRACIAS.....

Estefanyha Hernández Duarte

