



**ANALISIS DE LA PRESENCIA DE LOS COMPLEJOS ENZIMATICOS PKS I,
PKS II Y NRPS POR PCR Y/O ENFRENTAMIENTO DIRECTO EN
ACTINOBACTERIAS AISLADAS DEL RIO ARAUCA**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C, MARZO 2018**



**ANALISIS DE LA PRESENCIA DE LOS COMPLEJOS ENZIMATICOS PKS I, PKS II Y
NRPS POR PCR Y/O ENFRENTAMIENTO DIRECTO EN ACTINOBACTERIAS
AISLADAS DEL RIO ARAUCA**

DIHANA ESTEFANYHA HERNANDEZ DUARTE

Asesor Externo
LUIS EDUARDO DIAZ BARRERA
PhD en Ciencias Químicas

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO**

DEDICATORIA

En primer lugar quiero agradecer a Dios y la vida, por regalarme salud y llenar mi corazón de esperanza para no desfallecer continuando en este camino de vida y mi profesión Bacteriología, quienes conocen mi proceso saben que por más circunstancias que se presentaron puse la cara y me demostré que si se puede...

De igual forma, agradecer a mis padres por su apoyo incondicional, por mostrarme día a día que los sueños se deben seguir y pueden ser tangibles solo si se desea de corazón; muchas gracias por tantas enseñanzas y por ser mi bastón en los momentos que sentí decaer.

Mi negro, gracias a Dios por ponerte en mi camino y a ti por consolidar este gran proyecto llamado familia, eres tú y mis hijos uno de los pilares fundamentales en mi vida, infinitas gracias por tus consejos, tu dedicación, tu amor, tu paciencia, gracias por enseñarme a valorar cada espacio que tengo contigo. Te amo.

A mis preciosos hijos, ellos la luz de mi vida, mi esperanza, mis ganas de luchar, de levantarme cada mañana que aunque el cansancio se apodere de mi cuerpo, él quiere salir adelante y poderles brindar un mejor futuro, me hicieron poner la cabeza en alto y darme cuenta que el amor por los hijos fortalece. Mi Samu tú has sido mi centro de aprendizaje más grande frente a la vida, a ser mamá y mejor persona, tu que desde tan chiquito has sido juicioso y paciente para que mamá estudiara, me acompañaste en el vientre y estos 9 años mirándome con esos ojos que me decían que “debía seguir adelante” gracias por tu amor por ser tan juicioso y dedicado en tu colegio, por ayudarme en la casa y con tu hermanita cuando lo he necesitado, gracias mi bebe por ser mi pequeño valiente, a Mi Marian, princesita de mi corazón tu eres la

muestra de amor de tu papito y mía, la picardía de tus ojos, tus sonrisas al despertar y llantos porque a la madrugada me debo ir me han hecho saber lo importante que soy en tu vida y lo mucho que me amas, gracias por tanto amor hijitos de mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme llegar a donde estoy, por ser guía y luz en cada uno de mis pasos, por darme un propósito cada día siguiendo de su mano.

A mi familia quien ha estado incondicionalmente apoyándome no solo en este proyecto sino en el transcurso de mi vida, siendo el motor que me impulsa a salir adelante

A mi profe Luis Eduardo por permitirme haber realizado el proyecto con su grupo de investigación, quien me acompaño en este proceso brindándome su experiencia y dedicación en cada momento, por cada una de las cosas que aprendí de él y en esencia ser un buen y mejor ser humano.

A don Jorgito por todas las enseñanzas en cuanto a la biología molecular, a su lado aprendí de este pequeño pero gran universo por explorar infinitas gracias doy por todo su apoyo y consejos.

A todos los que confiaron en mis habilidades para ser Bacterióloga

TABLA DE CONTENIDO

1	Introducción	1
2	Antecedentes	5
3	Marco teórico	9
3.1	Actinomicetes	9
3.2	Policétidos	10
3.3	Biosíntesis de policétidos y péptidos no ribosomales.....	11
3.3.1	Biosíntesis de policétidos tipo PKS I y PKS II.....	11
3.3.2	Biosíntesis de péptidos no ribosomales	16
4	OBJETIVOS	19
4.1	OBJETIVO GENERAL	19
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
5	Diseño metodológico	20
5.1	Tipo de investigación.....	20
5.2	Población	20
5.3	Muestra	20
5.4	Hipótesis	20
5.5	Variables	21
5.6	Técnicas y procedimientos	22
5.6.1	Activación de actinomicetos	22
5.6.2	Identificación morfológica.....	23
5.6.3	Actividad antimicrobiana.....	23
5.6.4	Extracción de ADN	24
5.6.4.1	5.6.4.1 Amplificación del gen 16S rRNA.....	25
5.6.4.2	5.6.4.2 Identificación y presencia de genes mediante PCR	26
5.6.4.3	5.6.4.3. Secuenciación	28
6	Análisis estadístico	28
7	Resultados	28
7.1	Cultivos	29
7.1.1	Activación de actinomicetos	29
7.1.2	Identificación morfológica.....	31
7.1.2.1	7.1.2.1 Características Macroscópicas.....	31

7.1.2.2 Características Microscópicas	32
7.1.3 Actividad antimicrobiana	33
7.2 Interpretación de datos por técnica de enfrentamiento directo.....	35
8 Identificación Molecular.....	36
8.1 Extracción de ADN.....	36
8.2 Amplificación del gen 16S rRNA	37
8.3 Resultados de la técnica de PCR detección del gen PKS I, PKS II Y NRPS	39
8.3.1 Determinación de las concentraciones para la técnica de PCR	39
8.3.2 Amplicones para los Genes PKS I, PKS II Y NRPS	42
8.4 Interpretación de datos presencia de los genes PKS I, PKS II Y NRPS en PCR.....	46
9 Interpretación de resultados de las técnicas PCR y Enfrentamiento directo.....	48
9.1 Actividad antimicrobiana vs presencia de genes biosintéticos.....	48
10. Análisis estadístico	50
10 Discusión	51
12 Conclusiones.....	61
Referencias bibliográficas.....	63

TABLA DE FIGURAS

Ilustración 1 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).	12
Ilustración 2 Ruta básica de biosíntesis de ácidos grasos y poliéteridos. Las letras A, B, C y D se corresponden con los distintos grados de reducción que puede sufrir la cadena policetónica. (Sanz 2005).....	13
Ilustración 3 Mecanismo de reacción ruta biosintética PKS I y PKS II (Lehninger, 2007).....	14
Ilustración 4 Funcionamiento de un módulo prototipo de una NRPS. A Representación mínima de un módulo NRPS 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).....	17
Ilustración 5 Diagrama de flujo metodología del proyecto, Fuente: Autora.....	22
Ilustración 6 Representación gráfica de un enfrentamiento directo. Fuente: Método de prueba de un organismo para un antibiótico Mandigan et.al. 2012.....	24
Ilustración 7 Características macroscópicas de Actinobacterias evidenciando el crecimiento normal, Fuente: autora.....	30
Ilustración 8 Características macroscópicas de Actinobacterias evidenciando el crecimiento normal, Fuente: autora.....	31
Ilustración 9 características microscópicas de actinobacterias. , Tinción de Gram de algunas de las cepas aisladas y observadas en el objetivo de 100x. Fuente: Autora.....	32
Ilustración 10 El Método de prueba de un organismo para su espectro de actividad antibiótico. Autor: T. D. Brock, tomado de comercial products and Biotecnology 2009.....	34
Ilustración 11 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 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilina MRSA (ATCC BAA-44), <i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina VRE-(ATCC 700221), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 700603), y <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 21556), así :19 cepas, inhibieron el crecimiento de <i>B. subtilis</i> , 17 cepas, inhibieron el crecimiento de <i>S. aureus</i> , 9 cepas, inhibieron el crecimiento de <i>E. faecium</i> y 7 cepas, inhibieron el crecimiento de <i>K. pneumoniae</i>	35
Ilustración 12 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..	36
Ilustración 13 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.....	37

<i>Ilustración 14</i> De los productos de PCR aislado de los actinomicetos Fuente: A. Ayuso-Sacido and O. Genilloud(2003) Multiplex PCR amplification with A3F/A7R and K1F/M6R pairs of primers. Lanes, 1: <i>Amycolatopsis lactamdurans</i> NRRL 3802; 2: <i>Strep tomyces hygroscopicus</i> NRRL 5491; 3: <i>Micromonospora carbonacea</i> ATCC 27115; 4: <i>Kibdelosporangium aridum</i> ATCC 39323; 5: <i>Saccharo polyspora erythraea</i> NRRL 2338; 6: <i>Actinoplanes</i> sp. ATCC 33076.....	40
<i>Ilustración 15</i> Gel de agarosa Prueba piloto para la detección de los genes <i>PKSI</i> , <i>PKSII</i> Y <i>NRPS</i> , Pozo 2: muestra 627 <i>PKSI</i> , pozo 3: 445 <i>PKSI</i> , pozo 5: control reactivos <i>PKSI</i> , pozo 7: 627 <i>PKSII</i> , pozo 8: 445 <i>PKSII</i> , pozo 10: control reactivos <i>PKSII</i> , pozo 12: 627 <i>NRPS</i> , pozo 13: 445 <i>NRPS</i> , pozo 14: control reactivos <i>NRPS</i> , pozo 15: marcador de peso molecular <i>Hyperladder II</i> /lane.....	41
<i>Ilustración 16</i> Gel de agarosa prueba piloto para la detección de los genes <i>PKSI</i> , <i>PKSII</i> Y <i>NRPS</i> , pozo1: vacío, pozo 2: 445 <i>PKSII</i> , pozo 3: 160 <i>PKSI</i> , pozo 4: 160 <i>PKSII</i> , pozo 5: 284 <i>PKSI</i> , pozo 6: control de reactivos, pozo 7: marcador de peso molecular <i>Hyperladder II</i> /lane, pozo 8: 627 <i>NRPS</i>	42
<i>Ilustración 17</i> Porcentajes De Presencia del Gen En 30 Cepas De Estudio.....	43
<i>Ilustración 18</i> Gel de agarosa amplicones para los genes <i>PKSI</i> , <i>PKSII</i> Y <i>NRPS</i> pozo 1: cepa 5 <i>PKSI</i> , pozo 2: cepa 284 <i>PKSI</i> , pozo 3: cepa 126 <i>PKSII</i> , pozo 4: cepa 145 <i>PKSII</i> , pozo 5: cepa 186 <i>PKSII</i> , pozo 6: cepa 224 <i>PKSII</i> , pozo 7: cepa 235 <i>PKSII</i> , pozo 8: cepa 276 <i>PKSII</i> , pozo 9: control positivo <i>Streptomyces coelicolor</i> , pozo 10: <i>Hyperladder II</i> /lane <i>Bioline</i> , pozo 11: cepa 85 <i>PKSII-NRPS</i> , pozo 12: cepa 458 <i>PKSII-NRPS</i> , pozo 13: cepa 571 <i>PKSI-PKSII</i> , pozo14: cepa 572 <i>PKSI-PKSII</i> , pozo 15: cepa 160 <i>PKSI-PKSII-NRPS</i> , pozo 16: cepa 270 <i>PKSI-PKSII-NRPS</i> , pozo 17: cepa 326 <i>PKSI-PKSII-NRPS</i> , pozo 18: cepa 412 <i>PKSI-PKSII-NRPS</i> , pozo 19: cepa 445 <i>PKSI-PKSII-NRPS</i> , pozo 20: cepa 627 <i>PKSI-PKSII-NRPS</i>	44
<i>Ilustración 19</i> En esta gráfica se evidenció la presencia de los genes <i>PKSI</i> , <i>PKSII</i> y <i>NRPS</i> en PCR, mostrando que en 10 cepas se presentó el gen <i>PKSI</i> , así mismo que para el gen <i>PKSII</i> se evidencio su presencia en 16 cepas y finalmente <i>NRPS</i> se observó en 8 cepas, destacando que en 6 cepas se presenta más de un gen.....	46
<i>Ilustración 20</i> Diagrama de Venn para la clasificación de las 30 cepas, Fuente: autora.....	47
<i>Ilustración 21</i> Identificación, actividad antimicrobiana vs presencia de los genes <i>PKSI</i> , <i>PKSII</i> y <i>NRPS</i> de algunas cepas de Actinobacterias aisladas del río Arauca; Bacterias Gram positivas (G+) <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la metilicina MRSA (ATCC BAA-44), <i>Enterococcus faecium</i> resistente a la vancomicina VRE-(ATCC 700221), <i>Bacillus subtilis</i> bacterias Gram negativas (G -) <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 700603).....	49

TABLA DE TABLAS

Tabla 1 Programa PCR para la amplificación del gen 16S rRNA Fuente: Protocolo bioted bioted.es/protocolos/PCR-GEN-16S-ARNr-BACTERIANO.pdf	26
Tabla 2 Primers utilizados para la amplificación de los genes que codifican antibióticos en los complejos enzimáticos PKS _I , PKS _{II} y NRPS (Lee et al., 2014).....	27
Tabla 3 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).....	27
Tabla 4 Cepas de Actinobacterias incluidas en el estudio, Fuente: autora.....	33
Tabla 5 Identificación molecular de algunas cepas, por secuencias del gen 16S rRNA. Fuente: Autora	38
Tabla 6 Identificación, actividad antimicrobiana vs presencia de los genes PKS _I , PKS _{II} y NRPS de algunas cepas de Actinobacterias aisladas del río Arauca; Bacterias Gram positivas (G+) Staphylococcus aureus resistente a la meticilina MRSA (ATCC BAA-44), Enterococcus faecium resistente a la vancomicina VRE-(ATCC 700221), Bacillus subtilis bacterias Gram negativas (G -) Klebsiella pneumoniae (ATCC 700603)	48
Tabla 7 Comparación de la actividad antimicrobiana por Enfrentamiento directo vs técnica PCR	50



ANALISIS DE LA PRESENCIA DE LOS COMPLEJOS ENZIMATICOS PKS I, PKS II Y NRPS POR PCR Y/O ENFRENTAMIENTO DIRECTO EN ACTINOBACTERIAS AISLADAS DEL RIO ARAUCA

RESUMEN EJECUTIVO

El hallazgo de nuevos compuestos microbianos y de metabolitos secundarios bioactivos sigue siendo importante en la investigación de nuevos medicamentos. Por lo cual, se requieren estrategias con el fin de aumentar la probabilidad de conocer nuevas sustancias y propiedades que disminuyan el tiempo de elaboración y el costo de los procesos tradicionales de identificación, en la producción de nuevos medicamentos.

Así entonces, se planteó un estudio mediante la realización de una prueba de identificación molecular, como la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permitió detectar a nivel molecular en Actinobacterias aisladas de la ribera del Río Arauca la presencia de algunos genes biosintéticos pertenecientes a los complejos Policétido sintasa tipo I: PKS I, Policétido sintasa tipo II: PKS II y Péptido sintasa no ribosómicos NRPS.

Proceso en el cual se tomaron 30 cepas Pertenecientes a la Universidad de La Sabana, identificadas dentro del género *Streptomyces*, en las cuales gen que codifica para algunas enzimas de los complejos PKS I, PKS II y NRPS, fue amplificado en 18 cepas (60%); a diferencia de 12 (40%) cepas que no presentaron amplificación para los mismos genes; Se identificaron 6 cepas : 160 (*Streptomyces sp*), 326 (*Streptomyces sp*), 412 (*Streptomyces sp parvulus*), 445 (*Streptomyces sp*), 627 (*Streptomyces sp*) y 270(*Streptomyces sp*) con la presencia de los tres genes seleccionados, correspondientes a los complejos PKS I, PKS II y NRPS.

Se realizó una evaluación de la actividad antimicrobiana por enfrentamiento directo o antagonismo donde se determinó una actividad antibacterial preferencialmente hacia bacterias Gram positivas del 67%, comparando estas evaluaciones con los resultados de la técnica de PCR, indicando que las cepas que no presentaron amplificación pero si tienen actividad antimicrobiana, pueden producir antibióticos mediante otros mecanismos diferentes al objeto de estudio de la presente investigación.

Se concluye que la técnica de PCR disminuye los tiempos de evaluación de producción de metabolitos antibacteriales en cepas microbiológicas con una alta eficiencia y a bajos costos (frente a técnicas microbiológicas) aunque se debe ampliar el grupo de genes a evaluar a otros sistemas de síntesis de compuestos antibacteriales.

1 Introducción

Varias investigaciones han dado a conocer el incremento a la resistencia y a las enfermedades asociadas al cuidado de la salud, es por ello la importancia y búsqueda de bacterias que naturalmente sintetizen otro tipo de antibióticos, de esta manera se evitaría el uso de los fármacos clásicos, puesto que las bacterias patógenas hacen resistencia a los antibióticos existentes; un grupo de microorganismos que ha causado gran interés ayudando a la síntesis de la mayoría de metabolitos secundarios, son las Actinobacterias, debido a que más de la mitad de los antibióticos son producidos por los microorganismos del género *Streptomyces*; por lo tanto nuevos agentes antimicrobianos de Actinomicetos son necesarios para el control de patógenos humanos de manera natural. [1]

Los microorganismos son una fuente importante de compuestos bioactivos que son usados en medicina, agricultura, farmacología, veterinaria, industria de alimentos, entre otras [2]. Se estima que solo el 1% de los microorganismos existentes han sido identificados y caracterizados [3]. Sin embargo, este porcentaje debe aumentar como respuesta a la necesidad de nuevos antibióticos que permitan atacar la resistencia antibiótica por parte de microorganismos patógenos y la alta toxicidad de los antibióticos existentes [4,5].

El descubrimiento de un nuevo compuesto bioactivo lleva un proceso arduo y costoso, por lo cual, se necesitan procesos que permitan disminuir el tiempo de análisis [6]. , dando lugar a la búsqueda de técnicas como PCR, que permitan disminuir el proceso con respecto a las pruebas microbiológicas.

Tradicionalmente, la selección del grupo microbiano de interés se realiza con fundamento a criterios morfológicos y taxonómicos, generando mayor incremento económico y tiempo de procesamiento; No obstante, una evaluación previa, de los grupos microbianos con potencial para la producción de compuestos bioactivos, permitió identificar las secuencias de los genes como PKS I PKS II Y NRPS, los cuales se encuentran asociados a la biosíntesis de metabolitos secundarios y especialmente de antibióticos. Teniendo en cuenta lo anterior, estos genes, representan una alternativa para optimizar el estudio del potencial biosintético de grupos microbianos de interés taxonómico y de nuevos aislados [7,8,5].

Es importante reconocer el análisis molecular de microorganismos mediante la amplificación de secuencias de genes [8], ya que ha permitido el descubrimiento de nuevos compuestos de productos naturales[9]; Los compuestos bioactivos en Actinobacterias son biosintetizados por policétido sintetasas (PKSs) y sintetasas de péptidos no-ribosomales (NRPS) [10], PKS I, PKS II Y NRPS son los tres genes asociados a rutas biosintéticas que más se presentan.[8] Para conocer estas rutas de se han diseñado primers de PCR, dirigidos a secuencias de genes de dominios específicos de Actinobacterias [7,8], por lo cual, se favorece una detección rápida de enzimas biosintéticas, haciendo más eficiente su estudio.

El hallazgo de metabolitos secundarios, se ha evidenciado en las Actinobacterias, estas presentando diversas actividades biológicas y estructuras químicas, mostrando una capacidad ilimitada para producirlos [11, 12,13]. Por esta razón, en los últimos años las investigaciones a nivel mundial, se han centrado en la exploración de nuevos ambientes para el descubrimiento de Actinobacterias puesto

que se pueden responsabilizar de la síntesis de una amplia gamma metabolitos,[8] con el fin de combatir las bacterias patógenas resistentes a múltiples fármacos como el: (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina) SARM.

Por lo cual, es importante acercarse al reconocimiento de la geografía Colombiana, ya que se caracteriza por su gran biodiversidad de zonas tropicales, entre ellas la cordillera oriental, en donde recorren los principales ríos; estudios realizados en suelos de la región Amazónica del país en cercanías a San José del Guaviare, como también en Bogotá, indicando la presencia de poblaciones de Actinobacterias de las cuales se destaca el género *Streptomyces Sp*, lo que permite el abordaje de nuevas investigaciones en los diferentes ríos del país y espacialmente esta oportunidad en el rio Arauca , que nace en la cordillera oriental y desemboca en el rio Orinoco en Venezuela. Este río se caracteriza, por la presencia de gran cantidad de sedimentos, la mayoría de ellos de tipo arcilloso, en donde pueden habitar nichos ecológicos de estas especies. [14]

La región Amazónica que cuentan con ambientes como: pastizales, rastrojos, e hídricos donde se han encontrado Actinobacterias, y sabiendo de la gran diversidad de ambientes donde se han reportado como fuente de estos microorganismos, ha generado da la posibilidad de nuevas búsquedas como son; los ecosistemas de la población vegetal y de agua dulce típica de Arauca, estas características hacen de esta zona, un lugar de gran interés para estudios e investigaciones que permitan el hallazgo de diversos elementos para la creación de fármacos que pueden ser beneficiosos para la humanidad. [14,28]

El propósito de este estudio es determinar la presencia de los complejos enzimáticos, de los genes productores de metabolitos secundarios PKS I, PKS II Y NRPS mediante PCR, Posteriormente comparar las técnicas como son: técnica de enfrentamiento directo y técnica molecular PCR.

Así entonces, se analizaron las condiciones de los genes de los dominios KS, metilmalonil-CoA transferasa, KS α , KS β y el dominio de adenilación en los complejos enzimáticos PKS I, PKS II y NRPS, mediante la técnica de PCR y se compararon con la técnica microbiológica de enfrentamiento directo de cada una de las 30 cepas con el fin de evidenciar la inhibición y la propiedad antibacteriana hacia los microorganismo de prueba.

2 Antecedentes

Ayuso A. et al 2005, afirmó que los péptidos no ribosomales NRPS y los PKS-I, son polipéptidos multifuncionales, y estos se han convertido en blanco de descubrimiento de metabolitos biológicamente activos; así mismo, estos sistemas biosintéticos PKS-I y NRPS se han descrito extensamente no solo en actinomicetos sino también en diferentes grupos taxonómicos, como micobacterias, cianobacterias, hongos filamentosos y entre otros taxones bacterianos, este enfoque puede representar una alternativa de realizar un *screening* no solo en grupos microbianos de interés taxonómico sino también en aislados de tipo silvestre con el mayor potencial metabólico; este trabajo, diseñó y validó nuevos cebadores de PCR dirigidos a secuencias NRPS y PKS-I específicas para actinomicetos. [7]

Fischbach M.A. et al 2006, dieron a conocer que los sistemas PKS Y NRPS, surgen de una acción coordinada de varias fases de enzimas organizadas en líneas de ensamblaje; el orden e identidad de cada dominio de proteína está en la línea de ensamblaje específica, estas líneas de ensamblaje de PKS Y NRPS o híbridas PKSNRP, se han secuenciado en 240 genomas reportados, Esta información genética ha revelado que los genes PKS y NRPS están organizados en grupos, reflejando una regulación coordinada para activar la vía metabólica secundaria a demanda y posiblemente sugiriendo la transferencia horizontal de genes de estos grupos entre genomas microbianos para adquirir moléculas pequeñas con capacidades sintéticas útiles; el conocimiento de estos sistemas los sistemas PKS y NRPS proporciona que

la biosíntesis combinatoria es eficiente para crear colecciones de variantes de productos naturales con una nueva estructura y función.[19]

Barrios-Llerena M. E. et al 2007, afirmo que los metabolitos aislados de las cianobacterias han sido policétidos(PKS) y péptidos no ribosómicos(NRPS) o como un hibrido de las dos PKS Y NRSP, siendo estas cianobacterias posibles fuentes de metabolitos secundarios biológicamente activos. Así mismo las secuencias de proteínas en análisis mostraron el agrupamiento en dos grupos funcionales, comprendiendo dominios KS que usan acil-CoA como una unidad iniciadora o extensora, y el segundo representa los aislados de sistemas mixtos NRPS están involucrados en la síntesis de productos naturales. [10]

Zhao Q. et al 2008, establecieron que la azinomicina B. es un producto natural complejo que tiene propiedades potentes y antitumorales, los metabolitos policétidos que se biosintetizan mediante PKS y NRSP de tipo I, probablemente hace la biosíntesis de azinomicina B, debido a que las PKS iterativas comparten una homología tanto en la secuencia de los aminoácidos como en la organización de numerosos genes que codifican la biosíntesis de bloques para la producción de azinomicina B, evidenciando que las sintasas muestran un patrón donde se establece el escenario para investigar nuevos mecanismos enzimáticos.[20]

Meier J.L. y Burkat M.D. 2011, evaluaron que los productos naturales de péptidos y policétidos no ribosómicos se producen mediante catalizadores modulares conocidos como enzimas policétidos sintasa PKS y péptido no ribosómico NRPS que producen compuestos a nivel genético, determinando que hay compuestos únicos que interactúan con proteínas que le confieren ventajas de supervivencia a microorganismos, al facilitar la defensa química, comunicación entre especies y adaptación a nichos ecológicos definidos. [21]

Weber et al, 2014. Afirmaron que debido a la amenaza de patógenos resistentes a múltiples fármacos y el desarrollo de la tecnología para encontrar y producir nuevos compuestos han despertado el interés nuevamente hacia los actinomicetos que sirven como candidatos potenciales para el desarrollo de fármacos, además el análisis de las secuencias múltiples de los actinomicetos indica que cada bacteria puede producir aproximadamente 10 veces más metabolitos de los que se les ha detectado antes, permitiendo optimizar los rendimientos de producción y manipular directamente las vías biosintéticas para así poder generar productos modificados. [17]

Lee L-H. et al 2014, realizaron un estudio donde los *Streptomyces sp* aislados de manglares de Malasia, tienen la capacidad de producir potentes metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas, así mismo este estudio indico, que se está incursionando en el descubrimiento de fármacos con una nueva especie como: *Streptomyces pluripotens* buscando la inhibición y el crecimiento de MRSA, y hongos

dando lugar a una demanda crítica de nuevos productos naturales mediante las rutas biosintéticas PKS Y NRSP, debido a que varios de los aislamientos fueron positivos para estas rutas PKS I, PKS II Y NRPS de tal manera que las Actinobacterias aisladas de ambientes marinos poseen las características de producción de estos metabolitos. [13]

Da Cruz Pedro L. et al 2015, dieron a conocer que los policétidos y péptidos no ribosómicos son encontrados ampliamente en bacterias y hongos, estas actividades biológicas han atraído a la industria farmacéutica, debido a que al realizar ensayos en los que se encuentren las condiciones apropiadas para la búsqueda por grupos de genes que codifican un producto polipeptídico implica la clasificación de módulos enzimáticos en las bibliotecas de ADN genómico conservando las regiones KS (cetocinasa) AT (acetiltransferasa) en PKs y de adenilación (A) en los NRPs, es posible dibujar primers (oligonucleótidos) que puedan, en condiciones adecuadas, amplificar buena parte de los fragmentos correspondientes a estos dominios enzimáticos cortos y de esta forma prever si un determinado organismo presenta potencial para la producción de policétidos y péptidos no ribosomal, entre otros metabolitos . [15]

3 Marco teórico

3.1 *Actinomicetes*

Son organismos Gram positivos caracterizados por tener normalmente un alto porcentaje de guanina y citosina, poseen morfologías filamentosas algunos miembros que producen esporas a través de un ciclo de vida, son habitantes autóctonos de suelos y de suelos marinos, la población dominante puede ocurrir en ambientes extremos; los miembros de la clase actinobacteria van conectadas con el desarrollo de los antibioticos, pues las actinobacterias primordial al género *Streptomyces* exhiben genomas de más de 8MB que es una de las razones de su potencial para producir metabolitos bioactivos diferentes[63]

Por lo cual, la producción de metabolitos secundarios en los actinomicetos presentan una valiosa actividad biológica para los seres humanos, ya que se han convertido en una fuente importante de producción de antibióticos naturales; por ello, es necesario tener en cuenta que son un grupo de bacterias *Gram positivas* poseedoras de propiedades metabólicas. Así entonces los metabolitos secundarios se producen en condiciones específicas en contraste con los metabolitos primarios, [10] que ayudan al crecimiento y reproducción del organismo productor [16].

Teniendo en cuenta lo anterior, el 50% del género *Streptomyces* son los productores de los metabolitos secundarios, por estos se derivan aproximadamente el 75% de los antibióticos de uso comercial. [12] por tal motivo, los actinomicetos a través de los años han sido reconocidos por ser una fuente muy importante de antibióticos [17].

El genoma de los actinomicetos, entre ellos el género *Streptomyces*, presenta grupos de genes biosintéticos que codifican enzimas que favorecen la producción de policétidos y péptidos no ribosomales [11], clasificándose en dos importantes clases de metabolitos secundarios producidos por bacterias y hongos, biosintetizados por las enzimas policétido sintasas (PKSs) y sintetisas de péptidos no ribosomales (NRPS) respectivamente, con relevante actividad biológica, antibiótica, anticancerígena e inmunosupresora [18]. Estas, son enzimas intracelulares y multifuncionales que catalizan la biosíntesis de complejas estructuras básicas de muchos policétidos o péptidos no ribosomales. [17]

3.2 **Policétidos**

La biosíntesis de los policétidos y los péptidos no ribosomales se realiza a través de líneas de ensamblajes enzimáticas que tienen una organización modular [17], en las cuales cada módulo es responsable de la activación y condensación de una serie de unidades monoméricas en la molécula precursora [21]. Los policétidos son ensamblados desde precursores acilo tioester por condensación de Claisen descarboxilativa secuencial, y los antibióticos peptídicos son sintetizados a partir de aminoácidos por reacciones de formación de enlaces peptídicos secuenciales [22].

La biosíntesis de los policétidos depende de una unidad iniciadora (acetil-, propionil- y benzoil-CoA) y de sucesivas incorporaciones de unidades de elongación (Malonil- y metilmalonil-CoA) para así formar una cadena policetónica lineal y parcialmente reducida [19]. Para la biosíntesis de péptidos no ribosomales, producidos del metabolismo secundario de las bacterias por la condensación de los 20 aminoácidos proteinogénicos, una variedad mucho más amplia de aminoácidos no

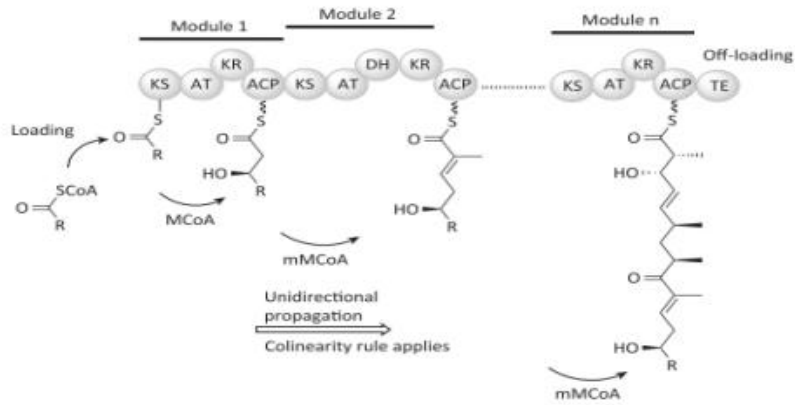
proteínicos, ácidos grasos y α -hidroxiácidos [23] son las unidades que permiten la elongación de la cadena [19].

3.3 ***Biosíntesis de policétidos y péptidos no ribosomales***

3.3.1 Biosíntesis de policétidos tipo PKS I y PKS II

La organización modular de las policétido sintasas está constituida por dominios con funciones específicas. En cada módulo siempre están presentes 3 dominios principales, 2 dominios catalíticos (aciltransferasa (AT), cetosintasa (KS)) y un dominio ACP (proteína transportadora de grupos acilo); dominios que son responsables de la elongación de la cadena principal del policétido mediante la incorporación de unidades extensoras [12]. Figura 1. La interacción de estos dominios difiere entre el tipo de policétido; para policétidos de tipo PKS I los dominios catalíticos y ACP están organizados en configuración Cis para formar módulos que se unen y construyen la línea de ensamble multimodular, mientras que para policétidos de tipo PKS II estos dominios existen como proteínas separadas que interaccionan en configuración trans formando complejos funcionales.[19]

a) *PKSI*



b) *PKSII*

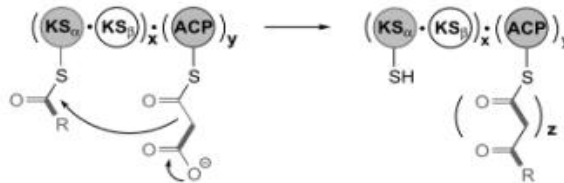


Ilustración 1 organización modular del complejo *PKSI* Y *PKSII* aciltransferasa (AT), cetosintasa (KS) y ACP (proteína transportadora de grupos acilo) Fuente: a) *PKSI* (Shen, 2003), b) *PKSII* (Hertweck, 2015).

En la línea de ensamble para policétidos tipo PKS I pueden existir varios dominios KS, AT y ACP que son usados una sola vez por modulo, mientras que para el ensamble de policétidos tipo PKS II solo existe un dominio KS, AT y ACP que son utilizados reiteradamente en la elongación del policétido. Algunos módulos contienen otros dominios como son β - cetorreductasa (KR), deshidratasa (DH) y enoilrreductasa (ER), que catalizan la reducción del carbono- β en la unidad extensora en una forma dependiente de NADPH. El paso final del proceso de biosíntesis de policétidos PKS I y PKS II es la liberación del producto policetonico final del dominio ACP mediante una reacción de hidrolisis o una captura intramolecular de un grupo -OH de la cadena policetónica mediante el dominio tioesterasa (TE) [19]. En cada ciclo de biosíntesis la

cadena puede crecer entre 2 o 3 carbonos. La biosíntesis de los policétidos tipo PKS I y II sigue la misma lógica que la biosíntesis de ácidos grasos, la única diferencia radica en la presencia de los dominios KR, DH y ER que siempre están presentes en la biosíntesis de ácidos grasos pero que son opcionales en la biosíntesis de PKS I y II dependiendo del grado de reducción del policétido final [19]. Figura 2 .

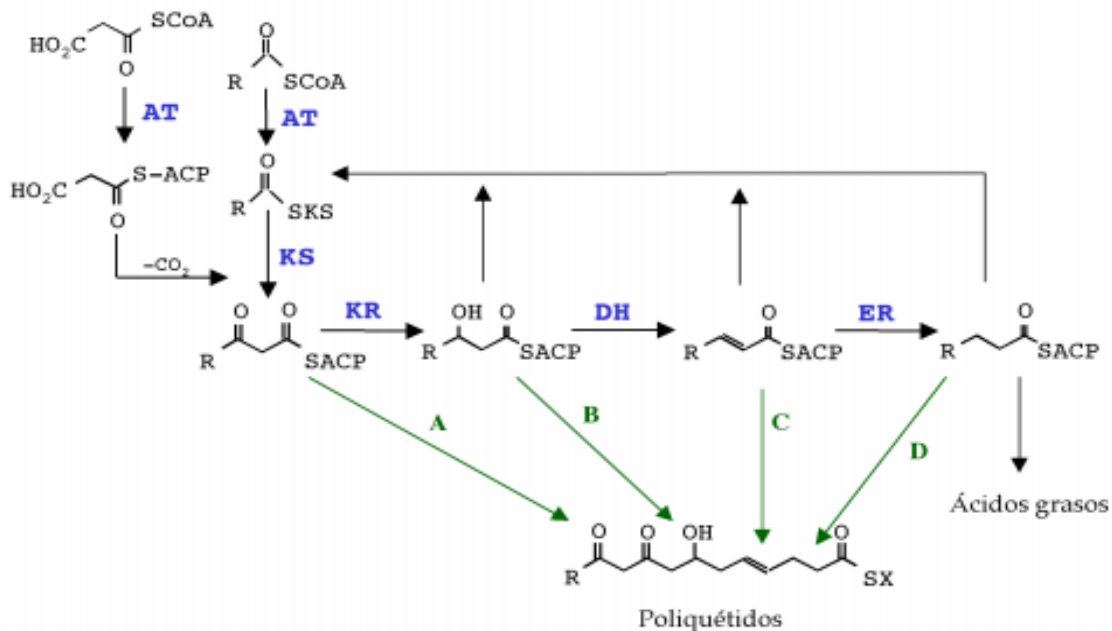


Ilustración 2 Ruta básica de biosíntesis de ácidos grasos y poliQUÉTIDOS. Las letras A, B, C y D se corresponden con los distintos grados de reducción que puede sufrir la cadena policetónica.(Sanz 2005)

Durante todo el proceso de biosíntesis de los policétidos tipo PKS I y II los sustratos e intermedios permanecen unidos covalentemente a uno de los dos grupos tiol del complejo. Los sitios de unión son el grupo –SH del residuo Cys en el dominio KS y el grupo –SH del dominio ACP con el que los intermedios acilo forman un tioéster mediante el grupo prostético 4'-fosfopanteteina [18]. Cargados los 2 grupos tiol del complejo enzimático con los grupos acilo correctos, se transfiere el grupo acetilo del acetil-CoA al grupo –SH de la Cys de la β-cetoreductasa (KS); esta reacción es

catalizada por la enzima aciltransferasa (AT), y se transfiere el grupo malonilo desde el malonil-CoA al grupo –SH de la ACP. Figura 3. La formación del enlace C-C se realiza mediante el paso de condensación de los grupos acetilo y malonilo activados que forman un grupo acetoacetilo unido a ACP a través del grupo –SH de la 4'-fosfopanteteina, produciéndose una molécula de CO₂; el grupo acetilo es transferido desde el –SH de la Cys de KS al grupo malonilo del –SH de la ACP generando así la unidad de dos carbonos, esta reacción es catalizada por la β-cetoreductasa (KS).Figura 3.

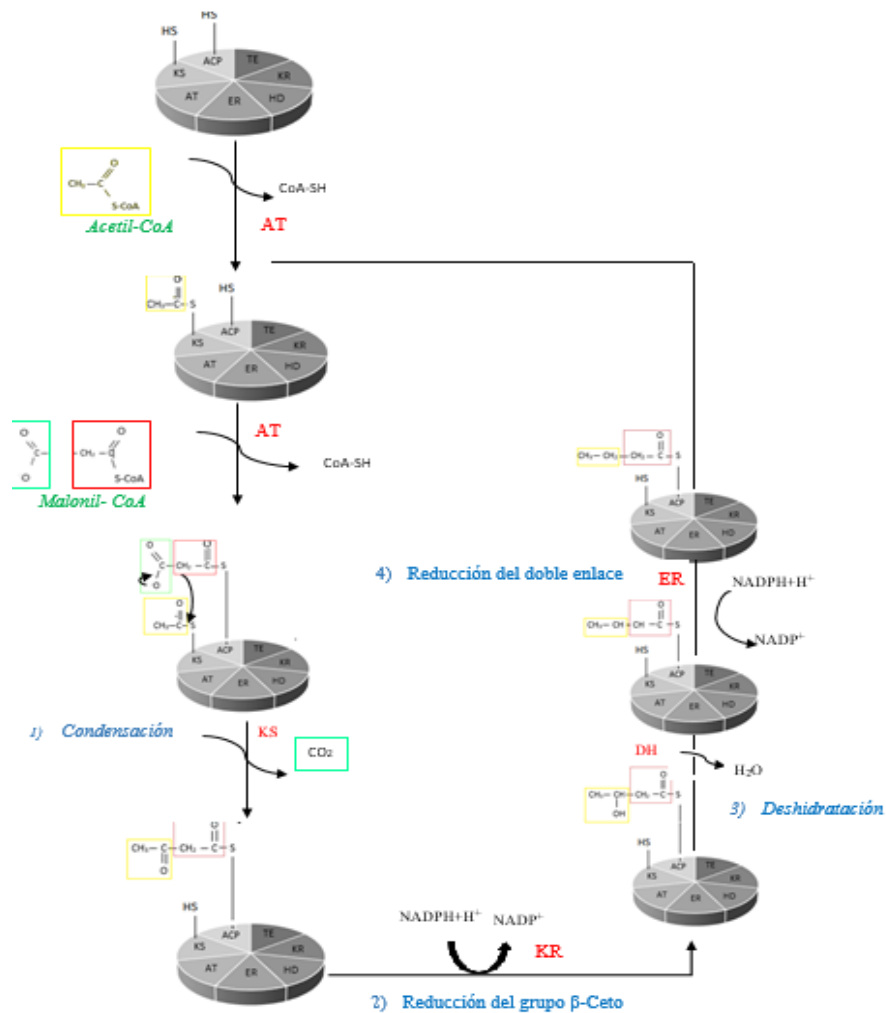


Ilustración 3 Mecanismo de reacción ruta biosintética PKS I y PKS II (Lehninger, 2007)

La versatilidad sintética de PKSs es determinada por el rango de unidades iniciadoras y extensoras de tioésteres de acil-CoA utilizadas por la maquinaria enzimática, por el número de unidades extensoras condensadas, la variedad de modificaciones redox y mecanismos de ciclación para determinado PKS [18]. Las modificaciones que puede sufrir la cadena policetónica son:

Reducción del grupo carbonilo. El producto de la etapa de condensación, se reduce seguidamente en el grupo carbonilo en C-3. Esta reacción es catalizada por la β - ceto-reductasa (KR), siendo el NADPH el donador de electrones. Figura 3.

Deshidratación. Se eliminan los elementos del H₂O de los carbonos C2 y C3 formando un doble enlace. La enzima que cataliza esta reacción es la deshidratasa (DH). Figura 3.

Reducción del doble enlace. El doble enlace formado en la reacción de deshidratación se reduce (satura) por acción de la enoil-reductasa (ER), siendo el NADPH el donador de electrones. Figura 3.

Los dominios que se encargan de las modificaciones redox operaran siguiendo la secuencia KR-----DH-----ER. Sin embargo, algunos productos de la condensación inicial en la biosíntesis de policétidos de tipo PKS I y PKS II no serán reducidos completamente debido a la ausencia o no funcionalidad de los dominios KR, DH y ER. Así, dependiendo de la reacción redox que sufra la cadena policetónica se tendrá como resultados policétidos con fracciones de intermedios como β - enoil, , β - hidroxiacil o β - cetoacil [19], Figura 2.

3.3.2 Biosíntesis de péptidos no ribosomales

El proceso de biosíntesis de los péptidos no ribosomales a través de la maquinaria enzimática de las sintetasas de péptidos no ribosomales es análogo al de los policétidos PKS I, debido a que la estructura de los complejos enzimáticos es similar. Sin embargo, estos complejos enzimáticos utilizan diferentes dominios químicos para la activación y condensación de sus sustratos [24].

Las sintetasas de péptidos no ribosomales poseen dominios con funciones muy similares a los dominios de las sintetasas de policétidos; los dominios equivalentes a los dominios AT, ACP y KS en las NRPS son adenilación (A) dominio responsable de la activación del aminoácido, dominio de tiolación o proteína portadora de grupos peptídicos (PCP) que permite la elongación de la cadena atando covalentemente el aminoácido activado y, un dominio de condensación que cataliza la formación del enlace peptídico y una serie de dominios adicionales (dominio metiltransferasa (MT) y dominio de epimerización) responsables de la diversidad estructural de los péptidos no ribosomales [19].

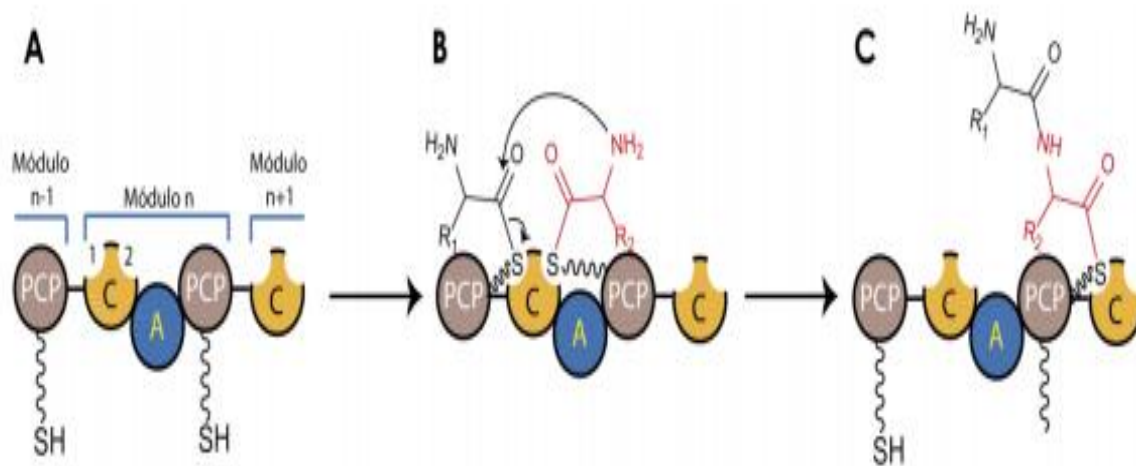


Ilustración 4 Funcionamiento de un módulo prototipo de una NRPS. A | Representación mínima de un módulo NPRS con un dominio C y un dominio PCP. B | Incorporación de la nueva molécula (rojo) a la cadena que proviene de hipotéticos módulos anteriores (negro). C | El dominio PCP cede la cadena para que ocurra el siguiente paso de condensación. Modificado de Finking y Marahiel (2004)

Los dominios A y PCP secuestran un aminoácido activado para formar el enlace peptídico. El aminoácido es activado en el dominio A mediante una reacción que consume ATP y genera un aminoacil adenilato altamente reactivo. El adenilato reacciona con un tiol terminal de la 4'-fosfopanteteína, que es post-traduccionalmente atado al residuo conservado de serina en el dominio PCP para formar un derivado tioester activado. El dominio C cataliza la formación del enlace péptido entre el tioester aminoacil atado al dominio PCP del mismo modulo y del módulo anterior. [25] Figura 4.

Aparte de los dominios principales, existen dominios con funciones muy específicas que modifican la estructura del péptido; el dominio de epimerización (E), que se encuentra entre el dominio PCP y el extremo terminal del dominio C del módulo, cataliza el equilibrio entre los isómeros L y D del C- α aminoácido antes o después de

la formación del enlace peptídico, y el dominio metiltransferasa (MT) que está insertado en el dominio A, que permite la metilación del nitrógeno del aminoácido.[25]

La liberación del péptido atado covalentemente al dominio PCP, se realiza a través del dominio TE mediante dos caminos; catalizando el ataque nucleofílico del agua generando un péptido lineal, o el ataque de un nucleofilo interno generando péptidos cíclicos. [25]

De esta forma vemos la necesidad de identificar que los metabolitos secundarios, que no son esenciales para el crecimiento del organismo productor de estructuras químicas complejas del organismo, son sintetizados generalmente al comienzo de la fase estacionaria, los productos originados suelen conferir ventajas ecológicas y consecuentemente una mayor competitividad biológica [27], innovando así con antibióticos novedosos para luchar contra patógenos resistentes a múltiples fármacos, haciendo un retorno a la selección de productos naturales como serían los policétidos [26]

4 OBJETIVOS

4.1 **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.

4.2 **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ❖ Obtener cultivos axénicos de *Actinobacterias* aisladas del río Arauca para su identificación morfológica y molecular
- ❖ 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
- ❖ 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)

5 Diseño metodológico

5.1 Tipo de investigación

La investigación realizada fue Experimental

5.2 Población

Actinomicetos extraídos del Rio Arauca

5.3 Muestra

Se escogieron 30 cepas aleatoriamente por conveniencia tomando las cepas que se encuentran en el banco de microorganismos de la Universidad de La Sabana previamente aisladas de la ribera del río Arauca, se estandarizaron las condiciones de cultivo para mantener estas mismas libres de contaminación cruzada.

5.4 Hipótesis

Ho: Las *Actinobacterias* aisladas del Rio Arauca no presentan genes que codifican para proteínas pertenecientes a los complejos enzimáticos PKS I, PKS II y

NRPS, que por técnicas microbiológicas evidencian producción de metabolitos antibacteriales.

Ha: Las *Actinobacterias* aisladas del Rio Arauca presentan genes que codifican para proteínas pertenecientes a los complejos enzimáticos PKS I, PKS II y NRPS, presentando producción de metabolitos antibacteriales por técnicas microbiológicas

5.5 *Variables*

Independientes: medio de cultivo, T°, pH, cepas de actinomicetos; indicadores pureza de las cepas, viabilidad de las cepas, crecimiento de la biomasa de las cepas las características macroscópicas y microscópicas.

Dependientes: determinación de genes biosintéticos, actividad antibacterial; indicadores técnica molecular, siembra en medio de cultivo

5.6 Técnicas y procedimientos

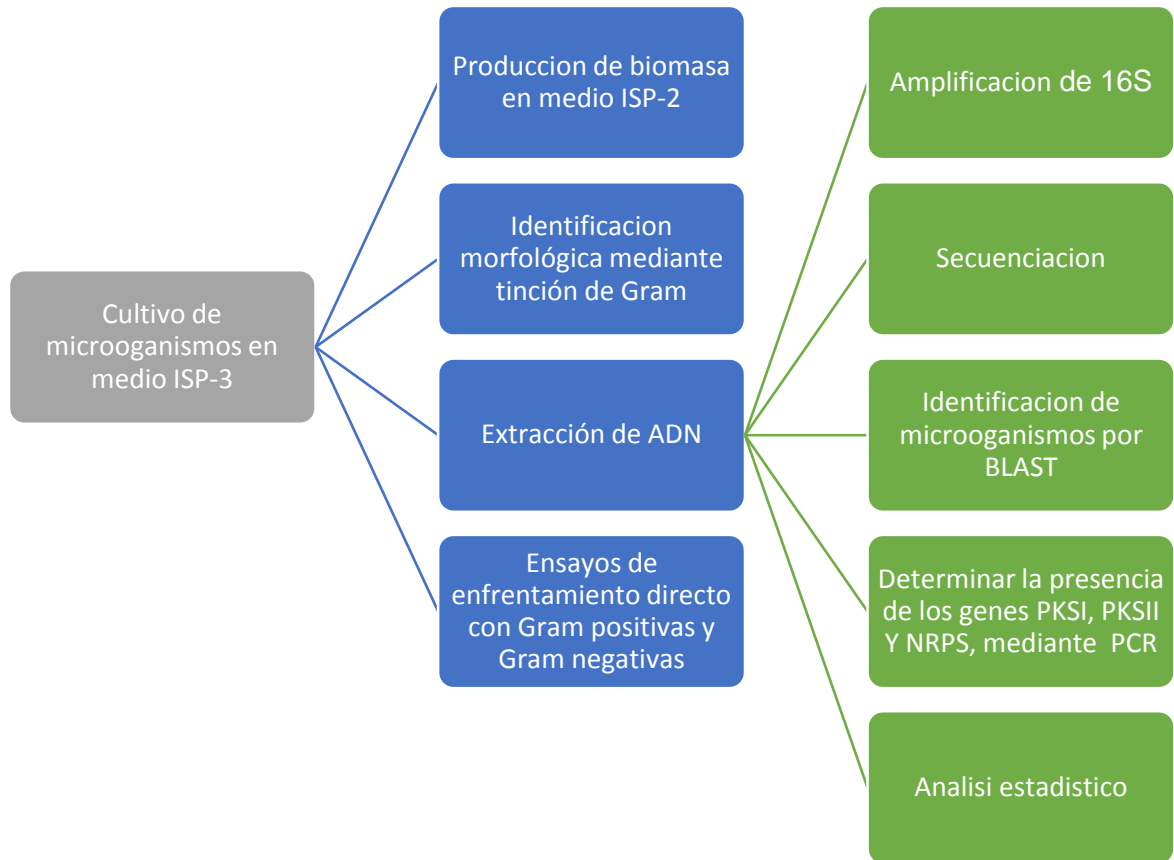


Ilustración 5 Diagrama de flujo metodología del proyecto, Fuente: Autora

5.6.1 Activación de actinomicetos

Inicialmente, se realizó la activación de 30 cepas de actinomicetos aisladas del Río Arauca en agar ISP-3 (avena 20g/L, $MnCl_2$ 0.001g/L, $ZnSO_4$ 0.001g/L, 15g/L agar) en cajas de petri se activaron las cepas durante 7 días a 30°C. Figura 5.

Seguido a ello, la producción de biomasa se realizó en tubos de vidrio con 10 ml de medio ISP-2 (glucosa 4g/L, extracto de malta 10g/L, extracto de levadura 4g/L). Cada tubo se incubó con agitación constante (250 rpm) a 30 °C durante 7 días. Figura

5

5.6.2 Identificación morfológica

Una vez transcurrido el tiempo de crecimiento, se realizó una primera evaluación, observando las características básicas de las colonias de actinomicetos, entre ellas su morfología delgada, plana, radial y posiblemente esporulada [28]. La presencia y característica morfológica del micelio vegetativo, hifas y esporas, se confirmaron mediante tinción de Gram [29].Figura 5.

5.6.3 Actividad antimicrobiana

La actividad antibacterial fue determinada inicialmente mediante el método de prueba de un organismo para un antibiótico [30]. Cada uno de los aislamientos fue cultivado sobre agar Mueller Hinton mediante sembrado masivo cubriendo un tercio de la caja e incubados a 30°C durante 7 días. Al cabo de este tiempo, las placas fueron inoculadas realizando una siembra de manera perpendicular a 3 mm de distancia de los aislamientos 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); Figura 6 y figura 10.

Estas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h y el antagonismo se observó por la inhibición del microorganismo probado, los resultados se expresan de la siguiente manera: zona inhibición de crecimiento >2 cm (+++): actividad alta, zona de inhibición 1-2 cm (++) : actividad moderada, zona de inhibición <1mm (+): actividad baja, no inhibición (-) [30,31,5,14].

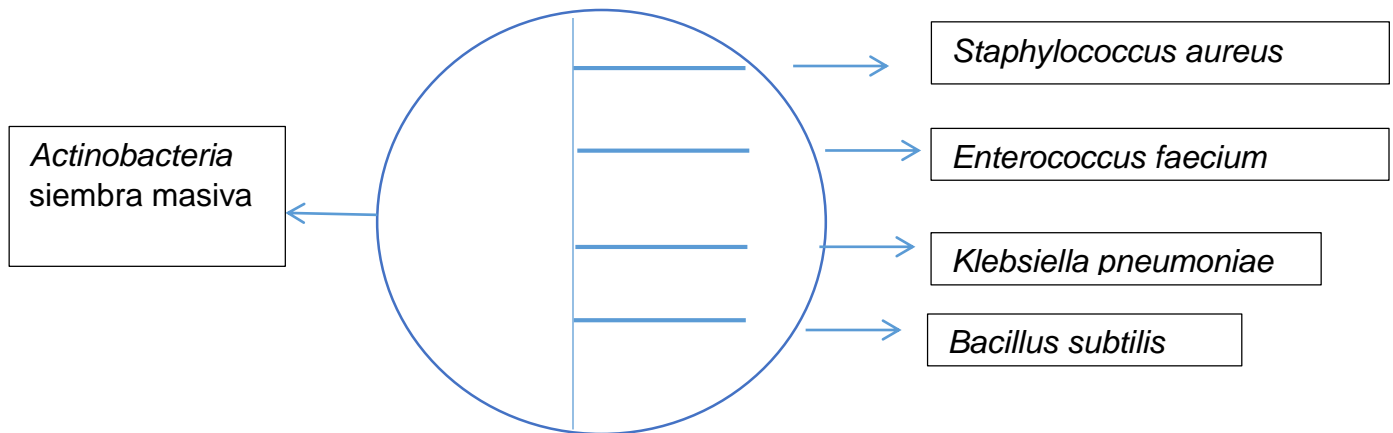


Ilustración 6 Representación gráfica de un enfrentamiento directo. Fuente: Método de prueba de un organismo para un antibiótico Mandigan et.al. 2012

5.6.4 Extracción de ADN

De las cepas cultivadas en medio ISP-2, incubadas con agitación constante (250 rpm) a 30 °C durante 7 días, se tomó una muestra de 2 ml de biomasa en un eppendorf, de cada una de las cepas a partir de los caldos de cultivo, se centrifugaron a 12.000 rpm por 10 min a 4°C hasta obtener un *pellet*, se mezcló con 30µl de lisozima a 10 mg/mL, se dejaron a 37° C durante 30 min. Luego en campana de extracción, agregar 50 µL de SDS AL 10%, 85 µL de NaCl 5M y 200 µL de Fenol:cloroformo:isoamilalcohol (25:24:1), se mezcló y se centrifugó a 12.000 rpm por 10 min a 4°C. Se separó el sobrenadante, se pasó a un tubo y se le añadió 250 µL de isopropanol, mezclando por inversión y luego se centrifugó por 30 min a 12.000 rpm y se removió el isopropanol. Se Agregaron 500 µL de etanol 70% frio, se dejaron decantar a temperatura ambiente por 5 min. Se Centrifugaron a 12.000 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y se dejó secar por 30 min. Para luego resuspender el extracto en 50 µL de Tris EDTA. El ADN genómico extraído se examinó mediante una electroforesis 1% (w/v) gel de agarosa. Se agregaron 4 µL de ADN y 2.0 µL de buffer de carga realizando la corrida durante 40 min 100 V. [14]

5.6.4.1 5.6.4.1 Amplificación del gen 16S rRNA

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, con la siguiente mezcla de reacción: de Taq polimerasa: a una concentración de 5U/µL, usando un volumen de 0,26 µL. Buffer NH₄: a una concentración 10X, usando un volumen 1,3 µL. Cloruro de magnesio: a una concentración 50 mM, usando un volumen 0,52 µL. dNTPs : a una concentración 10 mM, usando un volumen 0,26 µL. Primers: a una concentración 10 mM, usando un volumen 0,52 µL. DMSO: a una concentración de 100%, usando un volumen 0,21 µL. Templado de ADN 1 µL. La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando un termociclador BIO-RAD iCycler usando el programa de amplificación especificado en la Tabla 2. Los productos de PCR se confirmaron mediante electroforesis (1x TBE, agarosa al 1,5 %, 1.2 µL SYBR® safe DNA gel stain) y se compararon frente al marcador de peso molecular Hyperladder II para determinar el tamaño del producto de la amplificación [32]

Tabla 1 Programa PCR para la amplificación del gen 16S rRNA Fuente: Protocolo bioted bioted.es/protocolos/PCR-GEN-16S-ARNr-BACTERIANO.pdf

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

5.6.4.2 5.6.4.2 Identificación y presencia de genes mediante PCR

A partir del ADN genómico extraído, se realizó: la amplificación de los genes implicados en la síntesis de antibióticos, en los complejos enzimáticos PKS_I, PKS_{II} y NRPS, utilizando tres parejas de *primer* degenerados cuyas secuencias se especifica (tabla 2) así:

- Los *primers* K1F y M6R se utilizaron para amplificar los dominios KS y metilmalonil-CoA transferasa.
- Los *primers* KS α y KS β se emplearon para amplificar los dominios KS α y KS β
- Los *primers* A3F y A7R amplificaron el dominio de adenilación, respectivamente [7].

Tabla 2 Primers utilizados para la amplificación de los genes que codifican antibióticos en los complejos enzimáticos PKS I, PKS II y NRPS (Lee et al., 2014)

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 α	TSG CST GCT TGG AYG CSA TC	600
	KS β	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	

Todas las amplificaciones de los genes por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron en un termociclador BIO RAD i Cyclor.

El programa de amplificación que se utilizó fue el siguiente:

Tabla 3 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)

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	

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

5.6.4.3. *Secuenciación*

Se realizó la secuenciación del gen 16S rRNA y de cada uno de los genes analizados, 30 cepas en Macrogen (Corea). En la secuenciación del gen 16S rRNA se usaron los oligonucleótidos o primers 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'), 518F (5' CCAGCAGCCGCGGTAATACG 3'), 800R (5' TACCAGGGTATCTAATCC 3') y 1492R (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3') y para la secuenciación los genes de los dominios KS, metilmalonil-CoA transferasa, KS α , KS β y el dominio de adenilación se realizaron con los oligonucleótidos especificados en la tabla 3. Las secuencias del 16S rRNA y de los genes, se ensamblaron usando el programa Chromas Versión 2.5.1 y comparadas con la base de datos BLAST [14].

6 **Análisis estadístico**

Se construyó una tabla de 2X2 con los resultados positivos y negativos de cada una de las dos técnicas identificación antimicrobiana, Enfrentamiento Directo Positivo y PCR.

7 **Resultados**

Para esta sección, se hará énfasis en el desarrollo del proceso y su presentación paso a paso, el cual se encuentra sub dividido en los resultados presentados por las dos técnicas dando a conocer el desarrollo de la investigación.

7.1 . **Cultivos**

De las muestras recolectadas de la ribera del río Arauca, se sembraron medios de cultivos para la activación de los actinomicetos de las cepas crioconservadas del banco de microorganismos de la Universidad de La Sabana, posteriormente se realizó la identificación morfológica mediante la técnica de Gram, y luego la técnica microbiológica de prueba de un microorganismos a un antibiótico (enfrentamiento directo).

7.1.1. Activación de actinomicetos

Aquí observaremos las cepas de interés aisladas y activadas: en medios ISP-3 (medio solido) y ISP-2 (medio liquido)

Actinomicetos medio solido ISP-3

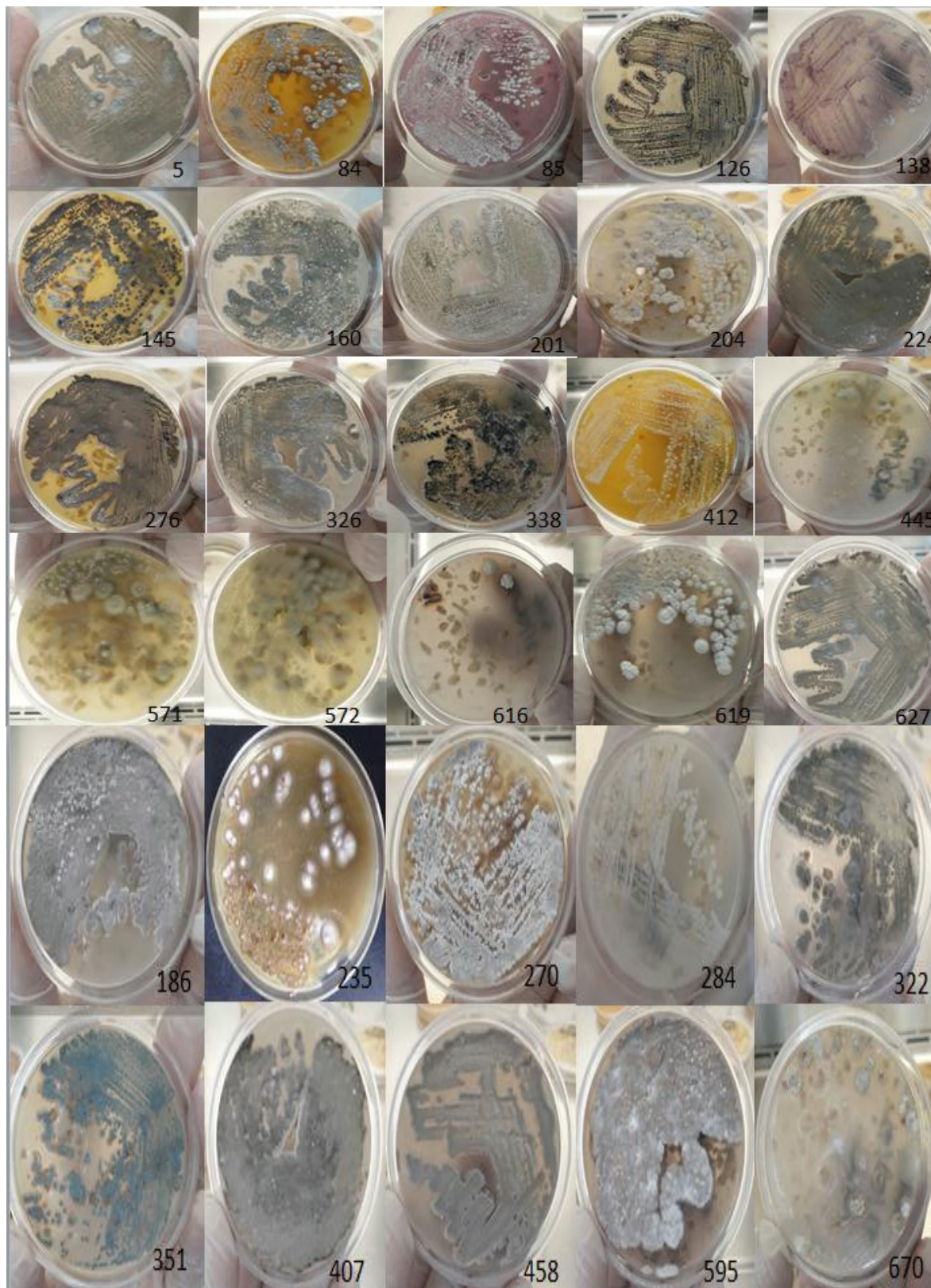


Ilustración 7 Características macroscópicas de Actinobacterias evidenciando el crecimiento normal, Fuente: autora

Actinomicetos medio liquido ISP-2



Ilustración 8 Características macroscópicas de Actinobacterias evidenciando el crecimiento normal, Fuente: autora

7.1.2 Identificación morfológica

Para la caracterización morfológica, se realizarán siembras para evidenciar las características de las 30 cepas, teniendo en cuenta que el estudio de la morfología de los Actinomicetos se basa principalmente en las características macroscópicas y microscópicas. [35]

7.1.2.1 Características Macroscópicas

En las muestras, se observó crecimiento apropiado, con las características macroscópicas de cada cultivo, a los siete días de incubación, se observó el crecimiento de diversas colonias de micelios aéreos, con gran formación de pigmentos como lo son morado, café, amarillo, blanco y naranja, algunas de sus colonias planas, rugosas y con una variedad de características inclusive el olor a ácido húmico que son característicos de su especie *Actinobacterias*. Figura 7 y figura 8.

La evaluación microscópica de estas cepas, se realizó posteriormente a estas siembras, teniendo en cuenta su morfología en forma de bacilos Gram positivos y presencia de estructuras miceliales con el fin de reconocer si eran *Actinobacterias*.

7.1.2.2 Características Microscópicas

Las características microscópicas que se observaron fueron: la formación de micelio vegetativo, ramificaciones en hifas o bastón, el micelio vegetativo crece entre el medio de cultivo o en la superficie del mismo, su función principal es la absorción de nutrientes para el crecimiento de las *Actinobacterias* y el desarrollo de hifas [14].

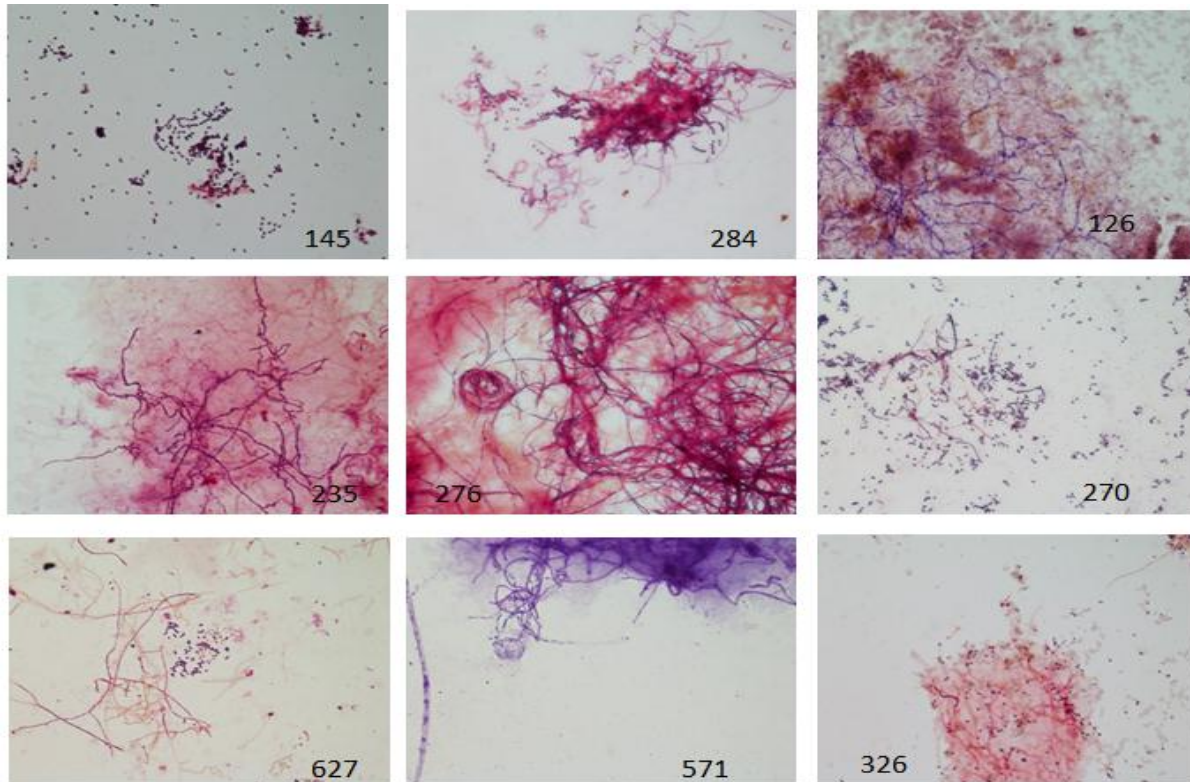


Ilustración 9 características microscópicas de actinobacterias. , Tinción de Gram de algunas de las cepas aisladas y observadas en el objetivo de 100x. Fuente: Autora

Después que las *Actinobacterias* dejan de crecer inicia la parte reproductiva, por la formación de hifas donde va a eclosionar la spora y se dará comienzo a un nuevo ciclo de vida [29]. Figura 9. Por ello, fue necesario tener en cuenta la presencia de estructuras como artroconidias, estructuras propias de los *Actinomicetos* mediante la coloración de Gram, la formación de micelio aéreo y crecimiento en los medios de cultivo [36].

7.1.3 Actividad antimicrobiana

Se determinaron 20 como positivas (o productoras de metabolitos antibacteriales), con inhibición a más de un microorganismo [30] y 10 como negativas (o no productoras de metabolitos antibióticos), con el fin de evidenciar las inhibiciones de las bacterias de importancia clínica por parte de las *Actinobacterias* en estudio.

Tabla 4 Cepas de *Actinobacterias* incluidas en el estudio, Fuente: autora

30 CEPAS ASIGNADAS PARA LA INVESTIGACION		
Con actividad antibacterial		Sin actividad antibacterial
5	276	186
84	326	235
85	338	270
126	412	284
138	445	322
145	571	351
160	572	407
201	616	458
204	619	595
224	627	670

Es de resaltar, que en las grandes industrias farmacéuticas para la producción de antibióticos se usa como prueba inicial el enfrentamiento directo;(Figura 10). Teniendo en cuenta lo anterior, en esta prueba las cuatro especies de bacterias de importancia clínica, presentaron inhibición a los metabolitos secundarios de las Actinobacterias aisladas, los cuales necesitan ser reconocidos para determinar si los compuestos que producen son nuevos o antibióticos ya conocidos; se identificó que varias especies que no crecen cerca del organismo productor, lo cual indica que produjo uno o varios antibióticos contra estas bacterias. [30]

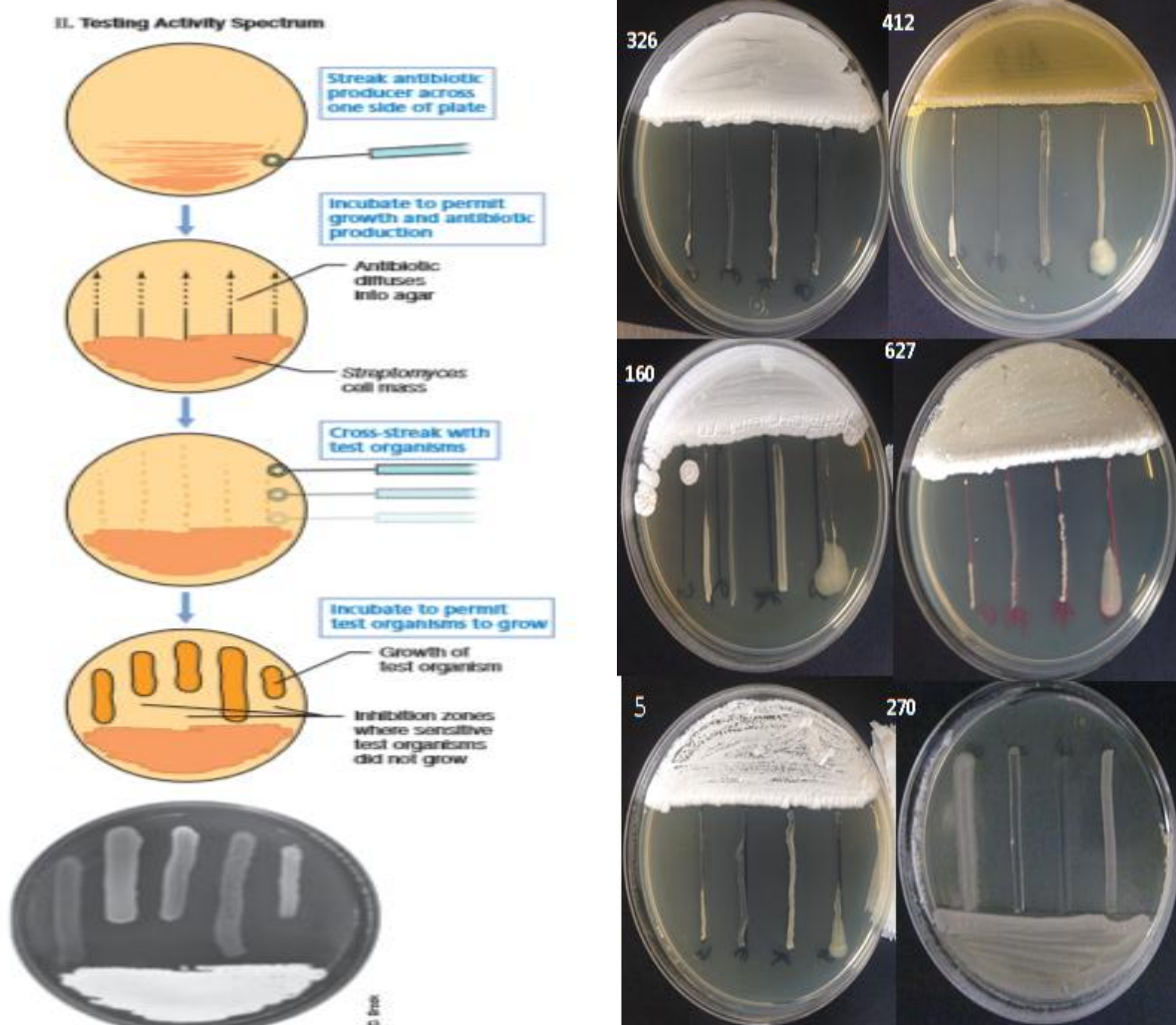


Ilustración 10 El Método de prueba de un organismo para su espectro de actividad antibiótico. Autor: T. D. Brock, tomado de *commercial products and Biotechnology* 2009

7.2 Interpretación de datos por técnica de enfrentamiento directo



Ilustración 11 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 metilina 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*

8 Identificación Molecular

8.1 Extracción de ADN

Para la obtención de ADN, se realizaron cultivos axénicos de las cepas en estudio después de la inoculación de éstos en el medio ISP-2, para la producción de biomasa incubándolas a 30°C con agitación de 250 rpm durante 7 días, para realizar así la extracción de ADN mediante la técnica de lisis celular. Figura 12

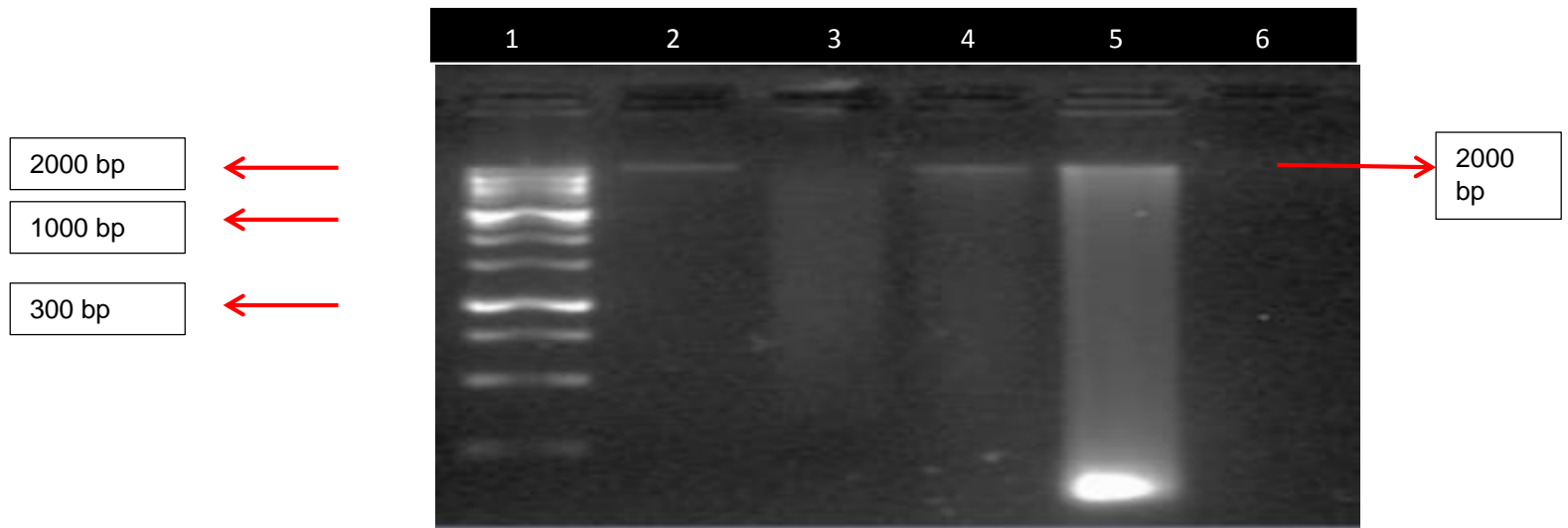


Ilustración 12 Gel de agarosa 1% (w/v) con algunas de las muestras de Actinobacterias después de la extracción ADN de los cultivos por lisis celular, pozo 1: marcador de peso molecular Hyperladder II/ lane, pozo 2: aislado 619 ADN total, pozo 3: aislado 571 ADN total, pozo 4: aislado 572 ADN total, pozo 5: aislado 616 ADN total, pozo 6: aislado 627 ADN total

8.2 Amplificación del gen 16S rRNA

Después de la Identificación de las características macroscópicas y microscópicas de las *Actinobacterias*, se procedió a la identificación molecular mediante la amplificación del gen 16S rRNA por PCR, donde se evidenciaron productos de 1600 pb. Figura 13

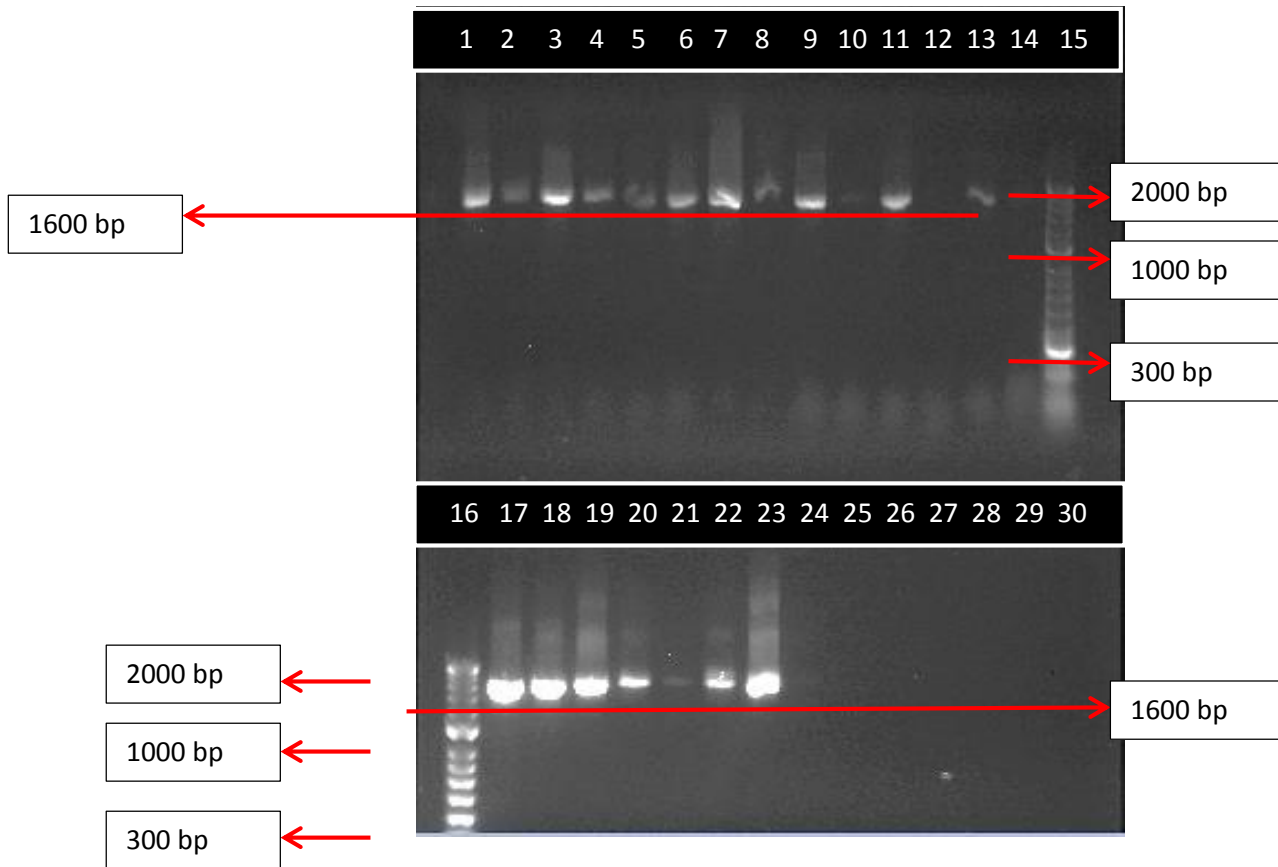


Ilustración 13 Gel de agarosa 1% (w/v) amplificación de la región 16s, pozo 1: aislado 186, pozo 2: aislado 235, pozo 3: aislado 270, pozo 4: aislado 284 pozo 5: aislado 322 pozo 6: aislado 351 pozo 7: aislado 407 pozo 8: aislado 458, pozo 9: aislado 595, pozo 10: aislado 670, pozo 11: aislado 619, pozo 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.

Las secuencias de las cepas seleccionadas fueron ensambladas usando el programa Chromas Versión 2.5.1 y comparadas con la base de datos BLAST [14]. los resultados obtenidos de algunas de las secuenciaciones se evidencian en la tabla 5.

Tabla 5 Identificación molecular de algunas cepas, por secuencias del gen 16S rRNA. Fuente: Autora

CEPAS	Nombre por BLAST	% de identidad
186	<i>Streptomyces sp, sirex AA-E</i>	100%
235	<i>Streptomyces sp.</i>	100%
270	<i>Streptomyces sp.</i> <i>TY53-2</i>	100%
284	<i>Streptomyces sp.</i>	100%
322	<i>Streptomyces sp.</i>	100%
351	<i>Streptomyces sp.</i>	100%
407	<i>Streptomyces sp. AUNIA-2</i>	100%
458	<i>Streptomyces sp. Strain. AC 13</i>	100%
595	<i>Streptomyces sp.</i>	100%
670	<i>Streptomyces sp. Strain. C9P1J</i>	100%
84	<i>Streptomyces sp.</i>	100%
85	<i>Streptomyces sp.</i>	100%
204	<i>Streptomyces sp.</i>	100%
224	<i>Streptomyces sp. Strain AB2</i>	100%
338	<i>Streptomyces sp.</i>	100%
412	<i>Streptomyces sp. parvulus</i>	100%

La identificación mediante 16S en *Streptomyces* es posible hasta genero [66] por tal razón la herramienta del gen 16S es conveniente para la delimitación de especies en *Streptomyces*, pero no para la diferenciación entre cepas, [14] debido a la gran homología que hay entre los miembros de esta familia en este gen, pero si permitió determinar que fueran Actinobacterias concretamente *Streptomyces sp.* Esto ha ocasionado problemas de sobre clasificación, donde muchas de las especies de *Streptomyces* son consideradas bacterias sinónimo [60] por esta razón sería necesario combinar otras técnicas que permitan la identificación completa de esta especie.

Las características generales de las cepas aisladas coinciden con la morfología que se presentó en el medio ISP-3 [29], como se puede identificar en investigaciones

donde los actinomicetos son importantes, en la clasificación e identificación generalmente con esporas hifas aéreas, con o sin pigmentos solubles en diferentes condiciones de crecimiento. Entre las principales características de diferencia están en la morfología de las Actinobacterias, especialmente de los estreptomicetos, esta característica es controlada por genes relevantes tanto como la morfogénesis, como la producción de antibióticos en los estreptomicetos [29].

8.3 Resultados de la técnica de PCR detección del gen PKS I, PKS II Y NRPS

Se realizó el *screening* de PCR para evidenciar la presencia o ausencia de los genes productores de metabolitos secundarios con actividad antibiótica [34] se tomaron 30 cepas para detectar la presencia de los genes PKS I, PKS II Y NRPS.

8.3.1 Determinación de las concentraciones para la técnica de PCR

La producción de metabolitos secundarios, es una temática a la vanguardia de la microbiología, con el fin de buscar mejores estrategias para la identificación de nuevos compuestos de manera natural; no obstante, existen técnicas que pueden reducir el tiempo y costos contando con igual efectividad y rapidez.

La PCR ha sido la primera herramienta diagnóstica [48], en el abordaje de numerosos campos de investigación como el análisis genético para la amplificación de fragmentos por clonación en células y tiene numerosas aplicaciones en diversos aspectos de la biología molecular [64]. Con respecto a esto para la realización de esta técnica, se contó con investigaciones que han dado a conocer las rutas enzimáticas de los genes biosintéticos y el uso adecuado de sus concentraciones

[7], lo que permitió la amplificación de un fragmento de los genes *PKSI* entre 1200 y 1400 bp [8], *PKSII* 600 bp y *NRPS* entre 700 y 800 bp., como es el la investigación específica de A. Ayuso-Sacido and O. Genilloud 2003 evidenciado en la figura 14

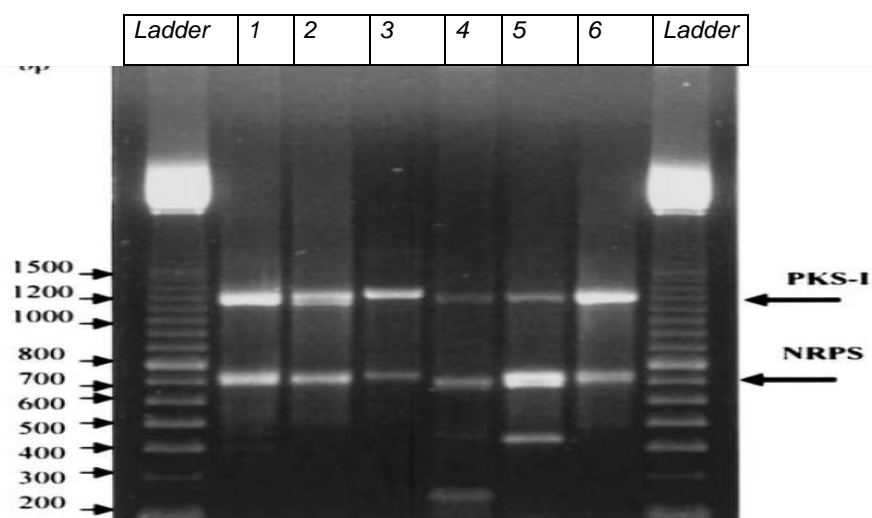


Ilustración 14 De los productos de PCR aislado de los actinomicetos Fuente: A. Ayuso-Sacido and O. Genilloud(2003) Multiplex PCR amplification with A3F/A7R and K1F/M6R pairs of primers. Lanes, 1: *Amycolatopsis lactamdurans* NRRL 3802; 2: *Strep tomyces hygrosopicus* NRRL 5491; 3: *Micromonospora carbonacea* ATCC 27115; 4: *Kibdelosporangium aridum* ATCC 39323; 5: *Saccharo polyspora erythraea* NRRL 2338; 6: *Actinoplanes* sp. ATCC 33076.

Este proceso fue elaborado con parejas de *primers* específicos para cada uno de estos genes. Tabla 2; los productos de la PCR fueron evidenciados mediante gel de agarosa 1.5% siendo desarrollados con la técnica de electroforesis donde se pudo evidenciar bandas o fragmentos para el gen, mediante la emisión de fluorescencia de SYBR® safe DNA, realizando varias pruebas piloto con varias cepas 627 y 445 genes *PKSI*, *PKSII*, *NRPS*. (Figura 15) cepas 627, 160, 284 y 445 genes *PKSI*, *PKSII*, *NRPS*, (figura 16).

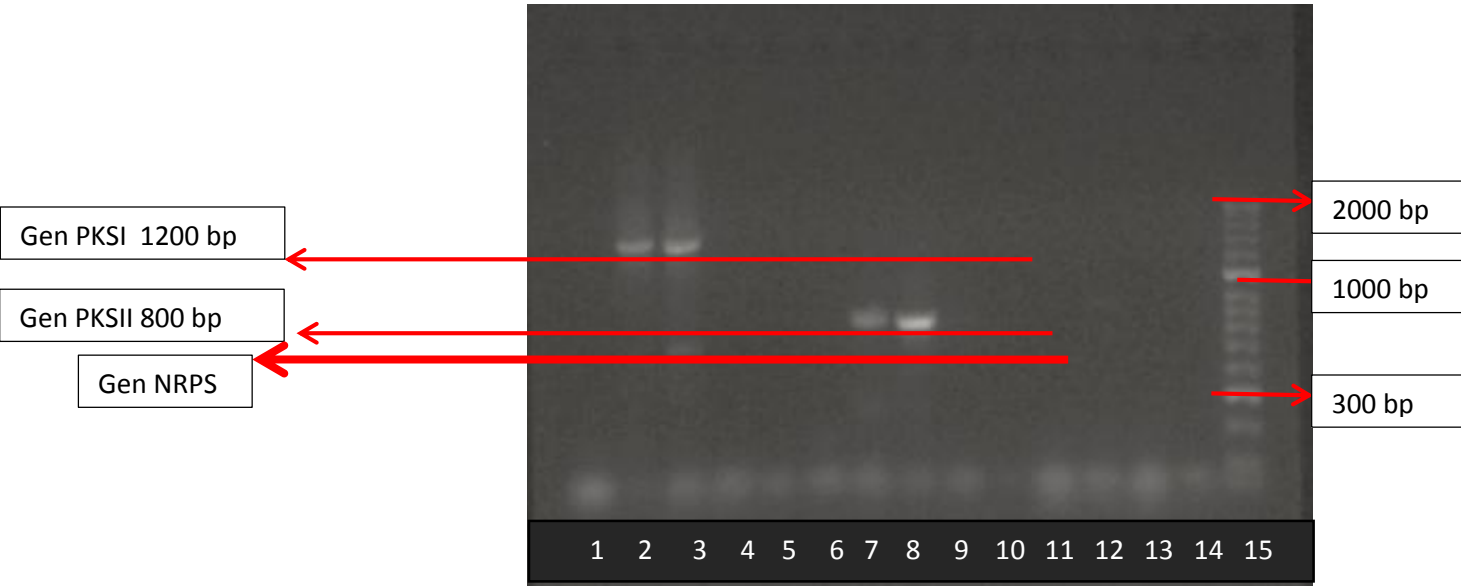


Ilustración 15 Gel de agarosa Prueba piloto para la detección de los genes PKS I, PKS II Y NRPS, Pozo 2: muestra 627 PKS I, pozo 3: 445 PKS I, pozo 5: control reactivos PKS I, pozo 7: 627 PKS II, pozo 8: 445 PKS II, pozo 10: control reactivos PKS II, pozo 12: 627 NRPS, pozo 13: 445 NRPS, pozo 14: control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

En este gel podemos evidenciar los fragmentos amplificados del gen PKS I en los pozos 2 cepa 627 y 3 cepa 445, en el pozo 7 cepa 627 y 8 cepa 445 la presencia de los amplicones del gen PKS II, como lo podemos contrastar con la Figura 15 del estudio, pozos 5,10 y 14 control de reactivos que evidencian las condiciones de no contaminación de las muestras. En el pozo 12, cepa 627 y pozo 13, cepa 445 no se observa la presencia del gen NRPS, se puede corroborar que aún hay presencia de exceso de primer que se está dimerizando en la parte inferior del corrido, de tal manera se realizó otro ensayo reduciendo la cantidad de primer para reducir los dímeros de primer

En la figura 16 podemos evidenciar la presencia de amplicones a la altura de la banda 1400 pb, las cepas 160 pozo 3 y 284 pozo 5, siendo característicos del gen

PKSI; las cepas 445 pozo 2 y 160 pozo 4, a la altura de 600 pb siendo característicos del gen PKSII, la cepa 627 pozo 8, a la altura de 700 pb, característica del gen NRPS.

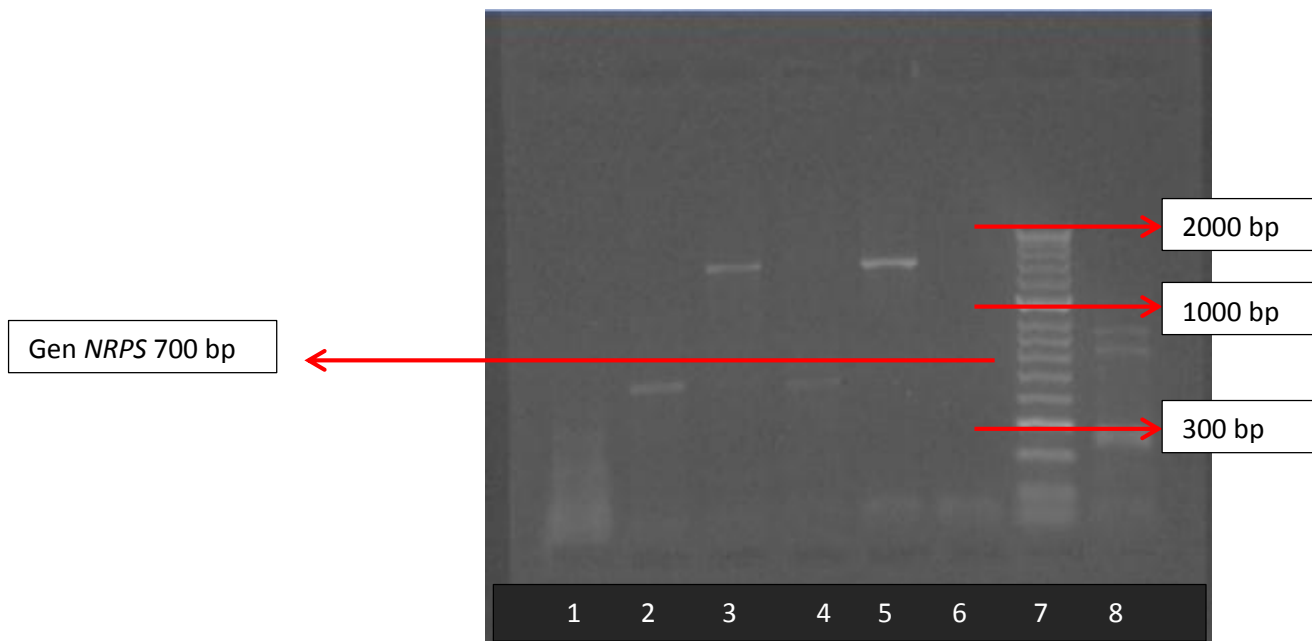


Ilustración 16 Gel de agarosa prueba piloto para la detección de los genes PKSI, PKSII Y NRPS, pozo 1: vacío, pozo 2: 445 PKSII, pozo 3: 160 PKSI, pozo 4: 160 PKSII, pozo 5: 284 PKSI, pozo 6: control de reactivos, pozo 7: marcador de peso molecular Hyperladder II /lane, pozo 8: 627 NRPS

8.3.2 Amplicones para los Genes PKSI, PKSII Y NRPS

En este estudio fueron evaluadas 30 cepas mediante la detección y amplificación de los genes biosintéticos PKSI, PKSII y NRPS; de las cuales en 18 cepas que representan el (60%) se identificó al menos uno, de los tres genes que sintetizan metabolitos secundarios PKSI, PKSII Y NRPS y 12 cepas que representan el (40%) no presentaron la presencia de ningún gen o presentan una ruta alterna para la síntesis de estos metabolitos. Figura 17.

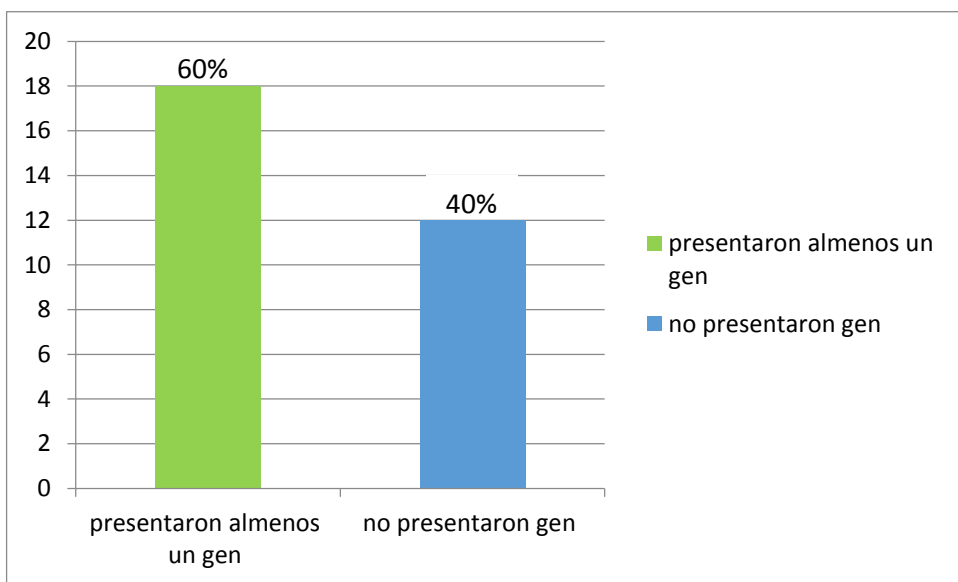


Ilustración 17 Porcentajes De Presencia del Gen En 30 Cepas De Estudio

Dentro de estas cepas, se pueden destacar que las 6 cepas: 160(*Streptomyces spp*, 270(*Streptomyces spp*), 326(*Streptomyces spp*), 412(*Streptomyces spp*), 445(*Streptomyces spp*), 627(*Streptomyces spp. CB01388*), presentan los tres genes PKS I, PKS II Y NRPS, donde han mostrado que las PKS y NRPS tienen una diversidad mayor en su potencial biosintético de lo esperado originalmente [24].

Los péptidos no ribosomales NRPS y las policétidos PKS comparten el mismo patrón biosintético por medio de las enzimas sintetasa y sintasa [50]; por lo tanto, la amplificación de los genes que codifican enzimas esenciales de las moléculas policetónicas implicadas en la biosíntesis de policétidos, proporcionan así secuencias de cebadores que podrían usarse para la amplificación por PCR y generar una herramienta prometedora de descubrimiento de fármacos [52].

Genes expresados en técnica PCR

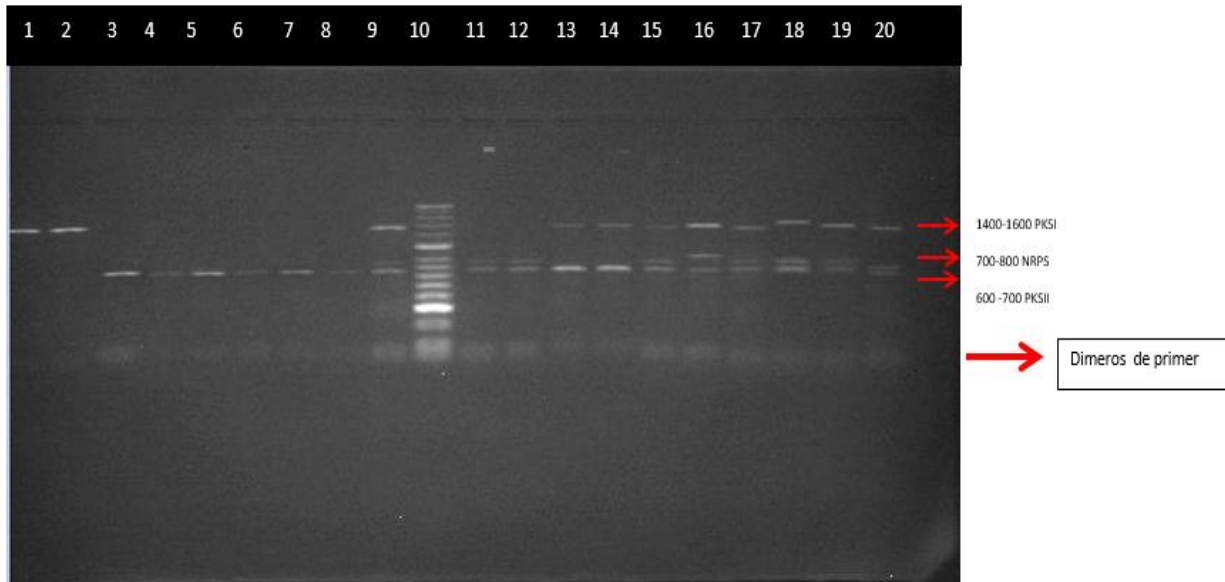


Ilustración 18 Gel de agarosa amplicones para los genes *PKSI*, *PKSII* Y *NRPS* pozo 1: cepa 5 *PKSI*, pozo 2: cepa 284 *PKSI*, pozo 3: cepa 126 *PKSII*, pozo 4: cepa 145 *PKSII*, pozo 5: cepa 186 *PKSII*, pozo 6: cepa 224 *PKSII*, pozo 7: cepa 235 *PKSII*, pozo 8: cepa 276 *PKSII*, pozo 9: control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

Como Control positivo: se tomó como referencia *Streptomyces coelicolor*, es considerada como una bacteria productora de la mayor parte de los antibióticos naturales. En concreto, *Streptomyces coelicolor* a partir de su genoma secuenciado, sirve para la identificación de nuevos genes implicados en la producción de antibióticos, en estudios de aislados de Actinobacterias *Streptomyces coelicolor* muestra unas frecuencias altas del 92% genes PKS I, PKS II Y NRPS en el genoma de estos actinomicetos [15] este microorganismo es un excelente modelo que contiene deleciones secuenciales, mostrando los genes biosintéticos de policétido sintasa PKS y péptido no ribosomal NRPS [55] de esto podemos deducir que las secuencias más completas del genoma de cepas productoras de metabolitos naturales de las cepas que se han estudiado es *Streptomyces coelicolor* [54] presentando los tres tipos de

genes PKSI, PKSII Y NRPS. Los resultados obtenidos de los actinomicetos aislados de la ribera del rio Arauca presentan un porcentaje significativo en la producción de metabolitos secundarios por parte de los genes biosintéticos *PKSI* *PKSII* Y *NRPS*.

Figura 18

8.4 Interpretación de datos presencia de los genes *PKSI*, *PKSII* Y *NRPS* en PCR

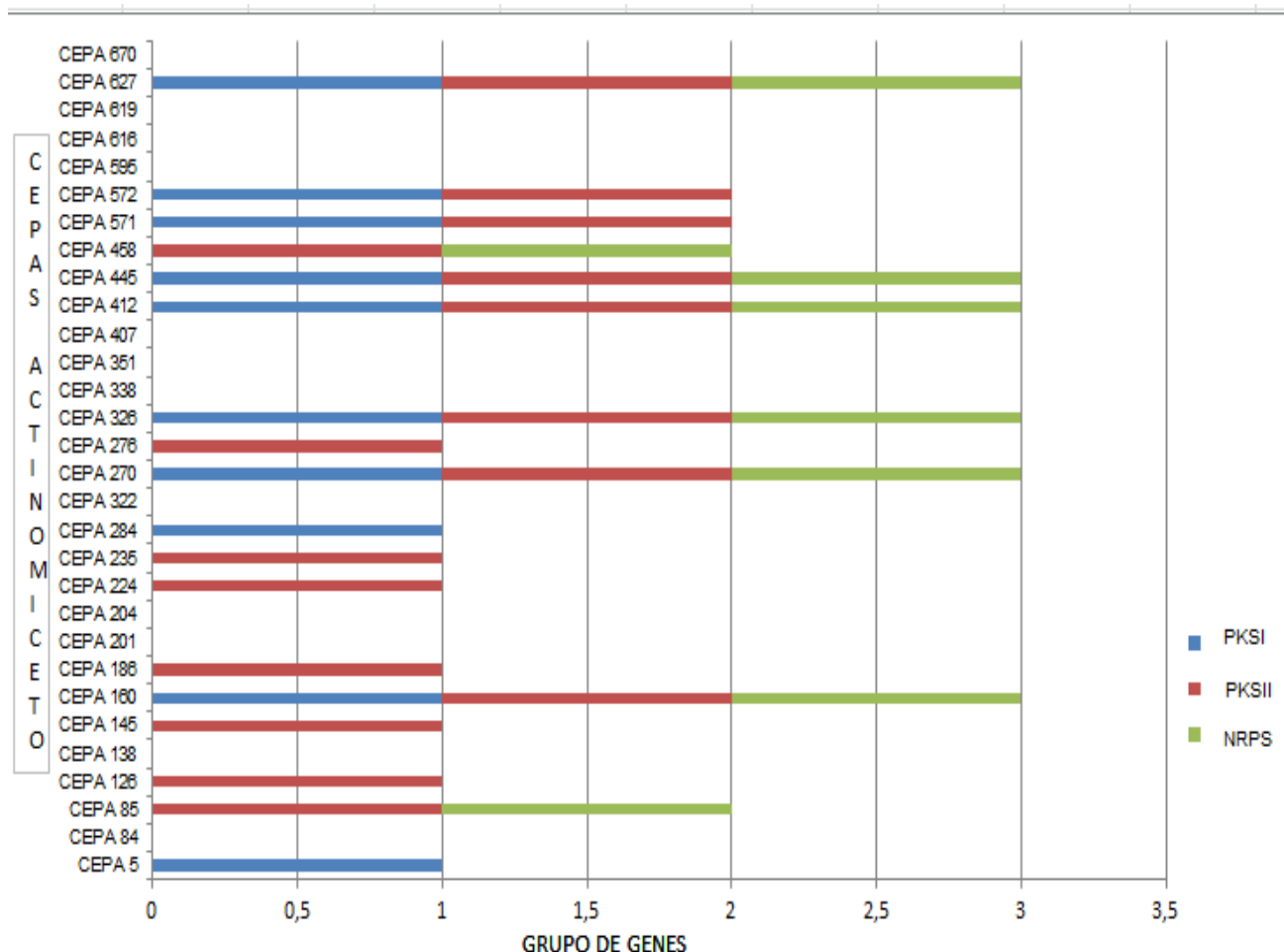


Ilustración 19 En esta gráfica se evidenció la presencia de los genes *PKSI*, *PKSII* y *NRPS* en PCR, mostrando que en 10 cepas se presentó el gen *PKSI*, así mismo que para el gen *PKSII* se evidenció su presencia en 16 cepas y finalmente *NRPS* se observó en 8 cepas, destacando que en 6 cepas se presenta más de un gen.

Es interesante observar que por lo menos uno de los tres principales sistemas de biosíntesis se presentó en las cepas investigadas; figura 19 sin embargo Se

puede identificar que para PKS I, fue amplificado en 2 cepas y el gen para PKS II, fue amplificado en 6 cepas, así como el gen que codifica solo para NRPS, no fue amplificado en ninguna cepa; de igual forma, no presentan ningún tipo de gen 12 cepas y las muestras que comparten la presencia de tres o dos genes PKS I, PKS II Y NRPS se evidenciaron que para 6 cepas se presentan los 3 genes y para 4 cepas dos genes.

Para la agrupación u observación de estos datos se hizo una representación en un diagrama de ven, Figura 20, donde se observa que hay algunas cepas que comparten 3 o 2 genes de péptidos no ribosomales y las policétidos.

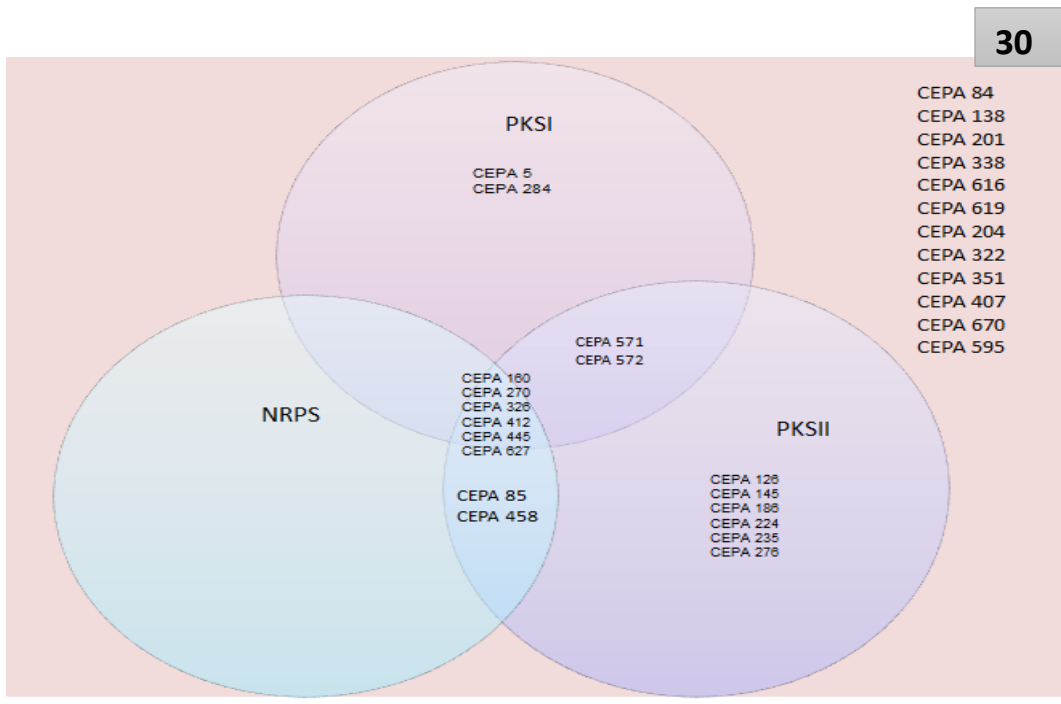


Ilustración 20 Diagrama de Venn para la clasificación de las 30 cepas, Fuente: autora

9 Interpretación de resultados de las técnicas PCR y Enfrentamiento directo

9.1 Diagrama de Venn para la clasificación de las 30 cepas **Se realizó la siguiente tabla en el desarrollo de la investigación para comparar las dos técnicas y ver la similitud o diferencia entre los resultados de ambas.**

Tabla 6 Identificación, actividad antimicrobiana vs presencia de los genes *PKSI*, *PKSII* y *NRPS* de algunas cepas de Actinobacterias aisladas del río Arauca; Bacterias Gram positivas (G+) *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina MRSA (ATCC BAA-44), *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina VRE-(ATCC 700221), *Bacillus subtilis* bacterias Gram negativas (G -) *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603)

Cepa	Nombre	Enfrentamiento Directo positivo				Resultado PCR		
		MRSA Gram Positivo	VRE Gram Positivo	<i>K.pneumoniae</i> Gram Negativo	<i>B. subtilis</i> Gram Positivo	PKSI	PKSII	NRPS
5	<i>Streptomyces albonipus</i>	✓	✓		✓	✓		
84	<i>Streptomyces</i> sp.			✓	✓			
85	<i>Streptomyces</i> sp.	✓		✓	✓		✓	✓
126	<i>Streptomyces</i> sp.	✓	✓		✓		✓	
138	<i>Streptomyces</i> sp. NEAU-JF7	✓		✓	✓			
145	<i>Streptomyces</i> sp. X3-5	✓	✓	✓	✓		✓	
160	<i>Streptomyces</i> sp.	✓			✓	✓	✓	✓
201	<i>Streptomyces</i> sp.	✓		✓	✓			
204	<i>Streptomyces</i> sp.	✓			✓			
224	<i>Streptomyces</i> sp. Strain AB2	✓	✓	✓	✓		✓	
276	<i>Streptomyces</i> sp.		✓		✓		✓	
326	<i>Streptomyces</i> sp.	✓	✓		✓	✓	✓	✓

338	<i>Streptomyces</i> <i>sp.</i>		✓					
412	<i>Streptomyces</i> <i>sp. parvulus</i>	✓		✓	✓	✓	✓	✓
445	<i>Streptomyces</i> <i>sp</i>	✓			✓	✓	✓	✓
571	<i>Streptomyces</i> <i>sp</i>	✓			✓	✓	✓	
572	<i>Streptomyces</i> <i>luteireticuli strain</i> <i>NRRL B-12435</i>	✓			✓	✓	✓	
616	<i>Streptomyces</i> <i>lunalinharesii</i> <i>strain 235</i>	✓	✓		✓			
619	<i>Streptomyces</i> <i>sp. 769</i>	✓			✓			
627	<i>Streptomyces</i> <i>sp. CB01388</i>	✓	✓		✓	✓	✓	✓
186	<i>Streptomyces</i> <i>sp, sirex AA-E</i>						✓	
235	<i>Streptomyces</i> <i>sp.</i>						✓	
270	<i>Streptomyces</i> <i>sp.</i> <i>TY53-2</i>					✓	✓	✓
284	<i>Streptomyces</i> <i>sp.</i>					✓		
322	<i>Streptomyces</i> <i>sp.</i>							
351	<i>Streptomyces</i> <i>sp.</i>							
407	<i>Streptomyces</i> <i>sp. AUNIA-2</i>							
458	<i>Streptomyces</i> <i>sp. Strain. AC 13</i>						✓	✓
595	<i>Streptomyces</i> <i>sp.</i>							
670	<i>Streptomyces</i> <i>sp. Strain.</i> <i>C9P1J</i>							

Ilustración 21 Identificación, actividad antimicrobiana vs presencia de los genes PKS I, PKS II y NRPS de algunas cepas de Actinobacterias aisladas del río Arauca; Bacterias Gram positivas (G+) *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina MRSA (ATCC BAA-44), *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina VRE-(ATCC 700221), *Bacillus subtilis* bacterias Gram negativas (G -) *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603)

✓ Presencia del gen e inhibición del microorganismo, no hay inhibición, no presencia del gen

10. Análisis estadístico

Tabla 7 Comparación de la actividad antimicrobiana por Enfrentamiento directo vs técnica PCR

		PCR		
		Positivo	Negativo	Total
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 identificación antimicrobiana, 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 secundaros. Se considera un valor significativo una $p \leq 0,05$

Se utilizó el programa estadístico SPSS versión 17,0

10 Discusión

Las Actinobacterias han sido usadas a lo largo de la historia para un número de actividades biológicas, desde hace más de 70 años [17] se ha venido estudiando el uso de los metabolitos secundarios, pero la identificación molecular a través de la genética, ha sido útil para generar sustitutos de antibióticos, [44] este enfoque ha permitido el acceso al ADN de comunidades bacterianas que sintetizan metabolitos secundarios que los responsables de la inhibición de otros microorganismos patógenos a bajas concentraciones.

Las expresiones de los policétidos y los péptidos no ribosomales permiten ser usadas mediante sus compuestos para futuras investigaciones; en los últimos años las investigaciones se han incrementado, por la necesidad de desarrollar fármacos contra una muestra amplia para patógenos resistentes.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el exceso de prescripción y el uso inadecuado de antibióticos, ha llevado a la resistencia de muchos patógenos; por lo cual, hoy en día las nuevas cepas resistentes aparecen con mayor rapidez, mientras que la tasa de descubrimiento de nuevos antibióticos ha disminuido notoriamente, [58] debido a los asociados con los tiempos de estudio que se requieren para su elaboración.

Es así como nace el interés de esta investigación, la cual tiene como propósito determinar la presencia de los complejos enzimáticos PKS I, PKS II Y NRPS mediante la técnica de PCR, debido a que en la actualidad los programas

de detección en el laboratorio constituyen una ruta más viable para descubrir antibióticos [30] reduciendo el tiempo y costo para su desarrollo.

Sin embargo, se debe aclarar que para el descubrimiento de un antibiótico, las industrias farmacéuticas tienen un tiempo promedio de 15 años y millones de dólares [30]; es por ello que se quiso demostrar la viabilidad de la realización de una técnica molecular PCR sin tener que llevar a cabo todo el proceso microbiológico y lo que implica.

Por ello se realizaron las dos técnicas para verificar los tiempos, costos, rapidez y sencillez [64] Encontrando que en la técnica de enfrentamiento, se observó que en el 67% de las cepas, se evidenció la producción de metabolitos secundarios, inhibiendo microorganismos de interés clínico como **MRSA**, **VRE**, **K. pneumoniae** y **B. subtilis**, mientras que el 33% no presentó ningún tipo de metabolito secundario; así entonces los aislamientos que presentan actividad antibacteriana contra *K. Pneumoniae*, se encontraron en 19 cepas, siendo este microorganismo patógeno Gram Negativo, el cual es causante de enfermedades infecciosas asociadas al cuidado de la salud y presenta resistencia a los antibióticos actuales [57], por su capacidad de producir carbapenemasas inactivan a los antibióticos carbapenémicos, los cuales son la primera opción para su tratamiento convirtiéndose este patógeno en un problema de salud pública [14]; Por ello, es un resultado de interés debido a la incidencia de enfermedades causadas por este microorganismo, de igual manera otros estudios han evidenciado actividad contra este patógeno [14].

Según los resultados de la presente investigación, se demostró que hay mayor actividad antibacterial contra *B. subtilis*, esta bacteria, gram positiva se encuentra en suelos, es susceptible a los compuestos producidos por las actinobacterias al ser antagonista de *Streptomyces* [14] de igual forma no es patógena para el ser humano y es un microorganismo que puede ser más sensible a los compuestos de las Actinobacterias, pues en su pared celular solo posee una capa de péptidoglicano lo que lo hace más susceptible a compuestos antibacterianos[65]

En este estudio *S aureus resistente a la meticilina MRSA* Gram positivo presento la segunda inhibición más elevada, esta bacteria es considerada también problema en los ambientes hospitalarios, al ser un patógeno multiresistente; sin embargo con el pasar de los días, ha sido de gran importancia tener otro recurso por la gran resistencia que se genera a estos microorganismos apreciando estudios en los cuales la capacidad inhibitoria de los actinomicetos marinos contra patógenos como *S. aureus* se da por origen actinomicetal [58]

Por otro lado la inhibición por *Enterococcus resistente a la vancomicina VRE*, no presenta un porcentaje muy alto; sin embargo, este microorganismo también tiene importancia clínica considerándose bacterias multi-drogo-resistentes MDR [59].

Por ello en la actualidad, se le apuesta a los productos naturales que den origen a nuevos antibióticos y es lo que podemos observar con las sustancias generadas por actinomicetos marinos actuando contra estos patógenos [58]

evidenciando así un nuevo camino para la creación de fármacos de manera natural.

Según la literatura se han reportado entre los actinomicetos que alrededor de 7600 compuestos son producidos por *Streptomyces* [61], siendo estos ampliamente utilizados como hospedadores para la expresión de genes [62] productores de metabolitos secundarios. Así los *Streptomyces*, se relacionan con estudios donde se ha identificado la producción de los antibióticos como fenelfamicinas G y H teniendo actividad inhibitoria contra *Propionibacterium acnés* [37]. De igual forma la producción de dos nuevos sesquiterpenos que muestran actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y la síntesis de fenamida [38]

Por otra parte, se sabe que los grandes productores de metabolitos secundarios con actividad biológica son los actinomicetos del género *Streptomyces spp*, [42] siendo el principal productor de compuestos como: **Salinamidas A y B**; los cuales son utilizados como antiinflamatorios de los tejidos, **Trioxacarcina**; empleada como Antimalarica: presenta efectos antiproliferativos; **Amilasas, Proteasas, Celulasas, Quitinasas** de utilización Enzimática para aplicaciones en las industrias de los alimentos, bebidas, fermentaciones, uso terapéutico, procesamiento de la pulpa de papel, elaboración de detergentes, tratamiento de desechos agroindustriales y del procesamiento de camarón, entre otras [45-44-43]

En algunos estudios realizados donde se plantea que *Streptomyces luteireticuli strain* y otras especies de *Streptomyces* de fines investigativos, dan a

conocer que muchas de las especies pueden ser asignada a grupos de *Streptomyces spp*, pero no pueden ser asignados a su especie [47].ya que al ser un grupo de bacterias tan numeroso, se requiere de estudios específicos para la identificación.

Por lo cual para el estudio de estas cepas que fueron identificadas como *Streptomyces sp.* por la secuenciación del gen 16S rRNA, siendo una herramienta específicas para su género mas no para su especie debido al gran número de especies descritas aproximadamente 3000[14] podemos evidenciar mediante comparación macroscópica y morfológica que cada una de las cepas cuenta con diferentes características propias de *Streptomyces spp*, los *Streptomyces* son consideradas bacterias sinónimo.[60] Por lo que sería necesario combinar otras técnicas que permitan la identificación completa de estas bacterias [14]

Teniendo en cuenta lo anterior, en la técnica de PCR, el 60% de las cepas, presentaron al menos uno de los tres genes productores de metabolitos secundarios PKS I, PKS II, NRPS, mientras que en el 40% de las cepas no se presentó ninguno de los genes, por lo cual las cepas que fueron expuestas a PCR, presentaron el gen PKS I en 10 cepas, siendo estas productoras de enzimas multifuncionales, organizadas en módulos responsables de un ciclo de elongación de la cadena [10], para la formación de las determinadas policétidos de tipo I, actualmente siendo representativas productoras de antibióticos por algunos de los metabolitos secundarios producidos como los B-lactámicos que

interfieren con la síntesis de la pared celular en bacterias Gram positivas[19,44] por esta ruta de biosíntesis como es PKSII.

Según los resultados obtenidos, el gen PKSII se presentó en 16 cepas siendo estas productoras de policétidos complejos multienzimáticos acíclicos, típicamente implicados en la biosíntesis de antibióticos aromáticos[10] los cuales producen antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas mediante los metabolitos secundarios tales como los aminoglucósidos en bacterias Gram negativas y sinérgicamente en bacterias Gram positivas[12,19, 44]. Por ello las cepas que emplean esta ruta de biosíntesis generan metabolitos que se biosintetizan de manera similar a las sintetasas de ácidos grasos [20]; es por esto, que han sido reconocidos como una fuente rica de agentes terapéuticos y medicinales los policétidos.

Por otro lado, los péptidos sintetasas no ribosomales se han descrito ampliamente como responsables de la síntesis de una gama amplia de metabolitos secundarios estructuralmente diversos en actinomicetos [8]. Por ello se da a conocer que a partir de esta investigación, el gen NRPS se presentó en 8 cepas siendo estos polipéptidos multifuncionales codificados por un número variable de módulos múltiples con actividades enzimáticas[7], los cuales producen metabolitos o antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular mediante glucopéptidos en bacterias Gram positivas por esta ruta de biosíntesis [44], también es importante destacar que hay gran interés en las rutas sintéticas de los productos naturales, debido a que la manipulación de la maquinaria de

NRPS ofrece una alternativa atractiva a los sintéticos y semisintéticos tradicionales[18].

Sin embargo, es de resaltar que en el proceso de determinación de la presencia del gen NRPS en las cepas hay menor presencia en comparación a los otros sistemas, se le puede atribuir a que los sistemas PKS I Y NRPS se pueden presentar como híbridos debido a que los péptidos no ribosómicos se biosintetizan mediante péptidos sintetasa no ribosomales o complejos de enzimas multifuncionales que ensamblan aminoácidos proteínogenicos o no proteínogenicos en la estructura peptídica[9] estos están compuestos de distintas secciones modulares donde cada una de las cuales es responsable de la incorporación de un fenómeno definido del producto final.[23]

En las 30 cepas que se aislaron y cultivaron en la técnica de enfrentamiento directo, los asilamientos mostraron que se tiene mayor actividad contra las bacterias Gram positivas, por el contrario en la técnica de PCR, se logró determinar la presencia de los genes PKS I, PKS II y NRPS, presentándose en mayor probabilidad los genes PKS I en 10 cepas Y NRPS 8 cepas, que tienen más afinidad por las bacterias *Gram positivas*, mientras que PKS II se presentó en 16 de las cepas teniendo mayor actividad por las bacterias Gram negativas.

Así entonces, se puede deducir que los genes *PKS I, PKS II Y NRPS* están presentes en las cepas aisladas de la ribera del río Arauca y continúan produciendo sustancias biosintéticas. Sin embargo, también se debe hacer claridad que en el análisis de PCR tiene la limitación de reconocer la diversidad de las actinobacterias y no detectar etapas importantes en cuanto al crecimiento

de estas [15].por lo cual se puede inferir que es una técnica que proporciona ventajas al investigador y puede ayudar a complementar los métodos de diagnóstico tradicional.

Así entonces, la muestra empleada en este estudio fue 30 cepas que corresponden al 100% y al determinarlas en las técnicas se encontró que la presencia de los genes policétidos y péptidos no ribosomales en las actinobacterias aisladas del río Arauca corresponde a un 60% y para enfrentamiento directo se observó en un 67%, de inhibición para microorganismos patógenos.

Por lo cual, se quiso identificar con la técnica microbiológica (Enfrentamiento directo) que 20 cepas son productoras de metabolitos secundarios sin saber por cual sistema hace inhibición del organismo al que fue enfrentado, al contrario de la PCR mostró que en 18 cepas la presencia de una o varias de las rutas enzimáticas que pueden tomar los metabolitos secundarios, teniendo como cualidad el reconocimiento específico del gen en que tienen presencias estos productores de antibióticos.

Lo que permitió, comprobar que hacer la PCR evidencia el potencial metabólico de las Actinobacterias, el cual merece ser estudiado debido a su arsenal biosintético único, que sigue orientando a la búsqueda de sustancias bioactivas para nuevas aplicaciones [15]. Siendo así necesario realizar las pruebas de manera complementaria, PCR y Enfrentamiento Directo puesto que cada una de las técnicas es independiente aportando información sobre el potencial uso de las bacterias productoras de antibióticos.

Este hallazgo inicial evidenció que para esta muestra tanto en Enfrentamiento directo, como en PCR no mostraron diferencias, aunque el número de positivos y de negativos fue bajo.

En los no acuerdos para la prueba estadística

Las 5 cepas que presentaron algún gen en PCR y en enfrentamiento directo no presentaron inhibición a ningún microorganismo o fueron negativas, posiblemente se debe a que en la técnica microbiológica no se alcanzó el grado de estrés, temperatura o condiciones que no permitieron que estos 5 actinomicetos hubieran producido sus metabolitos; debido a que la producción de metabolitos secundarios por parte de los actinomicetos no es una propiedad fija, ésta puede ser optimizada bajo diferentes condiciones de cultivo; por lo tanto los componentes del medio de cultivo y la capacidad metabólica del microorganismo productor influyen la biosíntesis de antibióticos y de los metabolitos secundarios en general.[67]

Además para las 7 cepas que en PCR no presentaron ninguno de los tres genes biosintéticos, pero en la técnica microbiológica si presentaron inhibición a los microorganismos de prueba, este hallazgo para esta muestra evidenció que es necesario ampliar la búsqueda de nuevas rutas biosintéticas por las cuales se sintetizan metabolitos secundarios. Es así que los compuestos producidos por actinomicetos presentan diversidad de estructuras químicas, esto se debe a la variedad de rutas metabólicas por las que sintetizan compuestos [68]

Mostrando así que PCR podría ser una alternativa para este hallazgo inicial, pero se necesitaría una mayor muestra debido a que el tamaño de la muestra que se escogió por conveniencia y no de manera aleatoria por los costos que se podrían generar, no permitió observar diferencia estadística en el estudio, debido a la capacidad y proporción de captar la presencia de agentes antimicrobianos es igual en las 2, necesitando más muestras para corroborar los valores como pruebas diagnósticas pero si dar un avance que por medio de este hallazgo dando fiabilidad a las técnicas usadas y que pueden ser complementadas.

Generando un llamado a los nuevos investigadores para contar con esta con estas herramientas que se encuentran a la vanguardia del desarrollo investigativo y científico para la humanidad, como también la disminución de tiempo y costos para la implementación de nuevos enfoque que aumentan las posibilidades de descubrir nuevos compuestos naturales.[26]

12 Conclusiones

❖ 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, esto validado mediante PCR y el análisis con cada uno de los ensayos para probar las concentraciones estándares.

❖ En el análisis realizado de las dos técnicas permite identificar la presencia y la producción de metabolitos secundarios y que sean estas sean propuestas como una herramienta de complementación de los diagnósticos tradicionales.

❖ La muestra 627 identificada como *Streptomyces* Sp. CB01388 Se puede establecer que tiene una buena actividad biosintética presentando los tres genes PKS I-PKS II Y NRSP vs el enfrentamiento directo presenta inhibición por bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* MRSA (ATCC BAA-44), *Enterococcus faecium* VRE-(ATCC 700221), *Bacillus subtilis* (ATCC 21556)

❖ Se puede afirmar que las Actinobacterias aisladas de la ribera río Arauca son una fuente rica en antibióticos sintetizados por el gen PKS I-PKS II Y NRP.

❖ Es importante tener en cuenta que para el gen NRPS, es necesario probar las condiciones de trabajo para la estabilidad de la técnica debido a que el cambio o las variaciones del protocolo se pueden generar cambios mostrando en los corridos únicamente el marcador de peso molecular

❖ Es de destacar que en esta muestra la PCR es una prueba alternativa que nos permite reducir el tiempo y costo con respecto a la prueba microbiológica

enfrentamiento directo, pero que se deben realizar de manera complementaria debido a que cada una de las técnicas 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.

Referencias bibliográficas

- [1] Ganesan P et al. Antimicrobial activity of some actinomycetes from Western Ghats of Tamil Nadu, India, *Alex J Med*(2016),2016.03.004. P; 1
- [2] Chen Y, M. J. Smanski, and B. Shen, "Improvement of secondary metabolite production in *Streptomyces* by manipulating pathway regulation.," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 86, no. 1, pp. 19–25, Mar. 2010.
- [3] Tiwari K, and Gupta R.K., "Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics.," *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 32, no. 2, pp. 108–32, Jun. 2012.
- [4] Metsa«-Ketela M et al, " An efficient approach for screening minimal PKS genes from *Streptomyces*" vol. 180, pp. 1–6, 1999.
- [5] Saravana Kumar P, Duraipandiyar V, and Ignacimuthu S, "Isolation, screening and partial purification of antimicrobial antibiotics from soil *Streptomyces* sp. SCA7". *Kaohsiung J. Med. Sci.*, vol. 30, no. 9, pp. 435–46, Sep. 2014.
- [6] Abdo A, Caboche S, Leclère, Jacques P, and Pupin M, "A new fingerprint topredict nonribosomal peptides activity.," *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, vol. 26, no. 10,pp. 1187–94, Oct. 2012.
- [7] 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
- [8] 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.
- [9] Micallef, M. L. D'Agostino, P. M., Al-Sinawi B. Neilan a, and Moffitt, M. C. "Exploring cyanobacterial genomes for natural product biosynthesis pathways.," *Mar. Genomics*, vol. 21, pp. 1–12, Jun. 2015.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12]. 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.
- [13] 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.
- [14] Pastrana N. C., "Evaluación de la actividad antibacterial y antifúngica de actinobacterias cultivables aisladas de las riberas del río guaviare," 2015.
- [15] 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
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] Williams G. J., "Engineering polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases.," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 23, no. 4, pp. 603–12, Aug. 2013.
- [19] Fischbach M. a and Walsh C. T, "Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal Peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms.," *Chem. Rev.*, vol. 106, no. 8, pp. 3468–96, Aug. 2006.
- [20] Zhao Q., He Q., Ding W., Tang M., Kang Q., Yu, Y., Deng W, Zhang Q., Fang J., Tang G., and Liu W., "Characterization of the Azinomycin B Biosynthetic Gene Cluster Revealing a Different Iterative Type I Polyketide Synthase for Naphthoate Biosynthesis," *Chem. Biol.*, vol. 15, no. 7, pp. 693–705, 2008
- [21] Meier J. L. and Burkart M. D., "Proteomic analysis of polyketide and nonribosomal peptide biosynthesis," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 15, no. 1, pp. 48–56, Feb. 2011. [22] C. D. Reeves, "The Enzymology of Combinatorial Biosynthesis," *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 23, no. 2, pp. 95–147, Jan. 2003.
- [22] Reeves C. D., "The Enzymology of Combinatorial Biosynthesis," *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 23, no. 2, pp. 95–147, Jan. 2003

- [23] Strieker M., Tanović A., and Marahiel M. a, “Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics.,” *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 20, no. 2, pp. 234–40, Apr. 2010.
- [24] Wenzel S. C. and Müller R., “Formation of novel secondary metabolites by bacterial multimodular assembly lines: deviations from textbook biosynthetic logic.,” *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 9, no. 5, pp. 447–58, Oct. 2005.
- [25] Challis G. L. and Naismith J. H., “Structural aspects of non-ribosomal peptide biosynthesis,” *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 14, no. 6, pp. 748–756, Dec. 2004.
- [26] Austin M.B., & Noel, J.P. (2003) “The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases”. *Natural product reports*, 20 (1) 79-110
- [27] Perez J. C., “Direccinamiento del metabolismo primario a metabolismo secundario para la evaluacin de la produccin de actinorrodina por medio de la modulacin de citrato sintasa y aconitasa en *Streptomyces coelicolor*” 2011
- [28] Arango C., “Bioprospeccin En Actinobacterias Cultivables De Las Riberas Del Rfo Arauca (Colombia),” 2015.
- [29] Li Q., Chen X., Jiang Y., and Jiang C., “Morphological Identification of Actinobacteria,” *Actinobacteria - Basics Biotechnol. Appl.*, no. i, p. 86, 2016
- [30] Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA & Clark DP (2012) *Commercial Products and Biotechnology. Brock Biology of Microorganisms*, (Cummings B, ed.) p.pp. 415-416
- [31] Omran R & Kadhem MF (2012) Isolation and Identification of antibiotic-producing actinomycetes. *Journal of Babylon University/Pure and Applied Sciences* 22: 285292.
- [32] Forner D., Berrué F., Correa H., Duncan K., and Kerr R. G, “Chemical dereplication of marine actinomycetes by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry profiling and statistical analysis.,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 805, pp. 70–9, Dec. 2013.
- [33] bioted.es/protocolos/PCR-GEN-16S-ARNr-BACTERIANO.pdf
- [34] Baltz R.H. “Antimicrobials from Actinomycetes: Back to the Future” *FEATURES Volume 2, Number 3 / Microbe* pp. 125-131 2007
- [35] Duraipandiyar V.et.al. “Antimicrobial properties of actinomycetes from the soil of Himalaya” *Journal de Mycologie Médicale* (2010) 20, 15—20.
- [36] Jiménez G, Tatiana Y, Los actinomicetos:Una visin como promotores de crecimiento vegetal” *Asesora: Marcela Franco-Correa repository.javeriana.edu.co* pp 9-30.2010

- [37] . Kulik A., Vikineswary S, Lim C., Yuan G., Tan A., Zinecker H., Imhoff J. F, Paululat T., and Fiedler H., “Phenelfamycins G and H , new elfamycin-type antibiotics produced by *Streptomyces albospinus* Acta 3619,” no. 58, pp. 257–266, 2011.
- [38] Yu L., Dai H. F, Zhao Y. X., Zuo W. J., Dong W. H., Mei W. L., and Zeng, “H. C. Two new sesquiterpene derivatives from soil actinomycete *Streptomyces albospinus* 15-4-2,” *Phytochem. Lett.*, vol. 6, no. 1, pp. 110–112, 2013.
- [39] El-shahed K. Y. I., Haroun B. M, Elsehemy I. A., Awad H. M., June M., and June M., “Antifungal Compound against Phytopathogenic Fungi Produced by *Streptomyces griseofuscus* NV-38 Screening , Isolation and Identification .,” *Res. J. Pharm. , Biol. Chem. Sci.*, vol. 7, pp. 785–795, 2014.
- [40] Forero,A., Sánchez S., Represion catabólica por carbono de bacterias Gram positivas, inteligencia alimenticia, instituto de investigaciones biomedical unam m.mx.biotecnologia, año 2008 vol 12 N° 2 24-44
- [41] Botas. A. M., Tesis doctoral “Regulación del metabolismo en *Streptomyces*: Control por ArgR”, Universidad de León Departamento de Biología Molecular Área de Microbiología, León, 2013
- [42] Reyes., T., A., et. al. Lucha Entre Microbios: Una Herramienta Para El Control De Enfermedades De Plantas., *Revista digital universitaria, revista. unam. Mx*, 1 de noviembre de 2015 | Vol. 16 | Núm. 11 | ISSN 1607 – 6079
- [43] Quiñones-Aguilar E. E. et al. Los actinomicetos y su aplicación biotecnológica. *Elementos* 101 (2016) 59-64
- [44] Evangelista-Martínez Z y Moreno-Enríquez A (2007). Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos. *Revista BioTecnología* 11:37-50.
- [45] 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.
- [46] 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.
- [47] 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

- [48] Bolivar, A., & Rojas, A., & Garcia Lugo, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en Biomedicina*, 3 (1), 25-33.
- [49] Heredia, G-C.,M.,F. Análisis molecular de una nueva poliquétido sintetasa en *Streptomyces antibioticus*, universidad complutense de Madrid Facultad de farmacia
- [50] Castillo A. R. Screening de genes biosintéticos de policétidos (pks) en una. Biblioteca metagenómica proveniente de suelo atlántico. Brasilerio, Universidad de Nariño 2013
- [51] Sanz, A., Aislamiento Y Caracterización De Genes De La Ruta Biosintética De Un Antifúngico Oxopentaeno Producido Por *Streptomyces Sp.* Universidad de Alcalá, Madrid, octubre de 2005
- [52] Courtois. S., Capellano, C. M.,Ball M., Francou, F-X., Normand, P., Helynck G., Pernodet, J-L.(2003). Recombinant Environmental Libraries Provide Access to Microbial Diversity for Drug Discovery from Natural Products. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1) 49-55
- [53] Aleti, G., Sessitsch, A., y Brader, G. (2015). Minería del genoma: Predicción de lipopéptidos y policétidos de *Bacillus* y Firmicutes relacionados. *Computational and Structural Biotechnology Journal* , 13 , 1923. 2015.03.003
- [54] Nadine Z., Mohammad A., y Tilmann W. “The evolution of genome mining in microbes – a review” *Journal Natural Products. Rep.*, 2016, 33, 988–1005
- [55] Zhou, Min & Jing, Xinyun & Xie, Pengfei & Weihua, Chen & Wang, Tao & Xia, Haiyang & Qin, Zhongjun. (2012). Sequential deletion of all the polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase biosynthetic gene clusters and a 900-kb subtelomeric sequence of the linear chromosome of *Streptomyces coelicolor*. *FEMS microbiology letters*. 333. 169-79. 10.1111/j.1574-6968.2012.02609.x.
- [56] Baltz, R. (2015). Genetic manipulation of secondary metabolite biosynthesis for improved production in *Streptomyces* and other actinomycetes. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 43. . 10.1007/s10295-015-1682-x.
- [57] Echeverri L.,M ; Cataño J.,C. *Klebsiella pneumoniae* as a nosocomial pathogen: epidemiology and drug resistance. *IATREIA / VOL 23/No. 3/ SEPTIEMBRE/ 2010* Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
- [58] León J et al, Study of marine actinomycetes isolated from the central coast of peru and their antibacterial activity against methicillin-resistant staphylococcus aureus and vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2011; 28(2): 237-46.

- [59] Calfee.D.P., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci, and other Gram-positives in healthcare. *Curr Opin Infect Dis.* 2012 Aug;25(4):385-94.
- [60] Anderson AS & Wellington EM (2001) The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 51: 797-814
- [61] Olano C.,Lombo F., Mendez C., Salas JA., (2008) Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering, *Metabolic Engineering*, 10, Pages 281-292 2008.
- [62] Baltz R.H., 2010, *Streptomyces* and *scchaloporypora* hosts for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *J. Microbiol Biotechnol* 37: 759-772.
- [63] En Wink, J., en Mohammadipanah, F., y en Ham, J. (2017). *Biología y biotecnología de actinobacterias*
- [64] Izquierdo R. M, Tom S y Read.G.A. Reacción En Cadena De La Polimerasa (PCR), <http://cosmolinux.no-ip.org/uned/pcr.pdf>
- [65] Nikaido, H., y Vaara, M. (1985). Base molecular de la permeabilidad bacteriana de la membrana externa. *Microbiological Reviews* , 49 (1), 1-32.
- [66] Sharma M (2014) Actinomycetes: source, identification and their applications. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3: 801-832.
- [67] Perez N.M. “Evaluación De La Actividad Antimicrobiana Y Citotóxica De Metabolitos Secundarios Producidos Por Actinomicetos Aislados De Suelos Colombianos” PUJ.2010
- [68] Vanek Z, Majer J. 1967. Macrolide antibiotics. In *Antibiotics II. Biosynthesis*. New York: Springer- Verlag.