

## Artículo original

# Condiciones de cultivo que fomentan la producción de sustancias antimicrobianas en actinomicetos patógenos y del suelo

Mayela del Carmen Uzcátegui Negrón<sup>a,\*</sup>, José Antonio Serrano<sup>a</sup>, María Mercedes Panizo<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de actinomicetos patógenos y del suelo. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de los Andes. Mérida.

<sup>b</sup>Departamento de Micología. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Caracas, Venezuela.

Recibido 7 de mayo de 2013; aceptado 24 de septiembre de 2013

**Resumen:** En el presente estudio fueron evaluadas 300 cepas de actinomicetos (140 de origen clínico y 160 del suelo). La producción de sustancias antimicrobianas del total de las cepas de actinomicetos fue evaluada utilizando los siguientes caldos: Bennett (M1), (M2), y el caldo levadura extracto de malta-dextrosa YMD (M3). Se ajustaron las condiciones óptimas de cultivo para lograr altas concentraciones de los metabolitos bioactivos. El proceso de fermentación fue utilizado en tiempos de incubación que variaron entre 5 hasta 10 días. La mayor producción de metabolitos bioactivos se obtuvo cuando se utilizó el medio de producción M2. La actividad antimicrobiana se vio favorecida con la adición de dextrosa, peptona proteosada y extracto de levadura y fosfato de potasio ( $K_2PO_4$ ), sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ ) x  $7H_2O$  y carbonato de calcio ( $CaCO_3$ ). Se relacionaron los patrones de crecimiento, la actividad antimicrobiana y la producción de biomasa en las cepas de actinomicetos en los tres medios de cultivo utilizados. Las cepas que presentaron fuerte actividad antimicrobiana contra la mayoría de las bacterias grampositivas, gramnegativas y hongos, fueron seleccionadas para futuros estudios donde se realizará la extracción, purificación y caracterización de los metabolitos bioactivos producidos.

**Palabras clave:** medios de cultivo, metabolitos bioactivos, actinomicetos, optimización, actividad antimicrobiana.

## Culture conditions that enhance the production of antimicrobial substances from pathogenic and soil actinomycetes

**Abstract:** The present study evaluated 300 actinomycetes strains (140 from clinical samples and 160 from soil samples). The production of antimicrobial substances by the total actinomycetes strains was evaluated using the following broths: Bennet (M1), (M2), and malt-dextrose yeast extract broth YMD (M3). Cultures were adjusted to optimal conditions in order to obtain high bioactive metabolite concentrations. The fermentation process was used with incubation periods which varied between 5 and 10 days. The highest bioactive metabolite production was obtained when the M2 medium was used. Antimicrobial activity was favored with the addition of dextrose, proteose peptone, yeast extract, potassium phosphate ( $K_2PO_4$ ), magnesium sulfate ( $MgSO_4$ ) x  $7H_2O$  and calcium carbonate ( $CaCO_2$ ). Growth patterns, antimicrobial activity, and biomass production of the actinomycetes were related to the three culture media used. The strains which showed strong antimicrobial activity against most gram positive and gram negative bacteria and fungi were selected for future studies where the bioactive metabolites produced will be extracted, purified, and characterized.

**Keywords:** culture media, bioactive metabolites, actinomycetes, optimization, antimicrobial activity.

\* Correspondencia:

E-mail: mayela\_uzcategui@yahoo.es

### Introducción

La producción de metabolitos secundarios biológicamente activos se ha atribuido a diversos microorganismos, sin embargo, estas sustancias se producen sólo bajo condiciones fisiológicas específicas [1]. Así mismo, cada metabolito secundario es producido por un limitado número de especies y se encuentra codificado en un grupo de genes

no indispensables, los cuales no son necesarios para su crecimiento y reproducción [2,3]. La mayor importancia de los productos bioactivos reside en las posibilidades que han abierto para el descubrimiento y creación de nuevas drogas comerciales de beneficio para el hombre [4]. Es por esta razón que los microorganismos retoman importancia vital en la investigación como fuente potencial de nuevos metabolitos secundarios, donde se pretende tener acceso

a estas sustancias bioactivas previamente no conocidas, y además superar las diferentes limitaciones e inferencias que se presentan en el proceso de su obtención [5].

El género *Streptomyces* ha sido el grupo de microorganismos más estudiado entre los actinomicetos, sin embargo, otros géneros de actinomicetos, tales como: *Actinomadura*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora*, *Amycolatopsis*, *Rhodococcus* y *Actinoplanes*, también han sido reportados como productores de nuevas sustancias bioactivas [6-10]. El medio ambiente y los factores genéticos pueden influir en la producción de metabolitos secundarios, donde el aislamiento del microorganismo se realiza en función del tipo de hábitat, a los tratamientos efectuados sobre el material, a los medios utilizados y las condiciones de incubación, estos aspectos son fundamentales en un programa de tamizado para el aislamiento de los distintos microorganismos [10-14].

La mayoría de las cepas productoras de metabolitos secundarios han sido aisladas de muestras de suelo, así como de otros ecosistemas como los océanos y ambientes variables donde existe gran diversidad de microorganismos [5,14]. Uno de los ecosistemas que es poco estudiado y no es tan comúnmente utilizado para la búsqueda de metabolitos secundarios, son las cepas de actinomicetos aislados de casos clínicos. Lemriss *et al.* [9] evaluaron la producción de metabolitos bioactivos con actividad antifúngica en cepas de origen clínico. Sin embargo, en la práctica el número de condiciones utilizadas para cada microorganismo, es muy limitado [11,14,15]. En el presente estudio se describe la optimización de algunas condiciones de crecimiento utilizando tres medios de cultivo y distintos tiempos de incubación para el proceso de fermentación, con la finalidad de aumentar la producción de metabolitos bioactivos en cepas de actinomicetos aisladas de casos clínicos y del suelo.

## Materiales y métodos

*Aislamiento y procedencia de las cepas de actinomicetos:* Fueron utilizadas 300 cepas de actinomicetos (160 provenientes del medio ambiente y 140 de origen clínico). Las muestras fueron recolectadas y procesadas según el protocolo citado por Uzcátegui-Negrón y col. [16]. Las cepas aisladas del suelo correspondieron a los siguientes estados venezolanos: Mérida (zonas aledañas a la carretera de San Juan de Lagunillas), Barinas (zonas aledañas a la carretera de Barinitas-Barinas), Portuguesa (terreno de cultivo de caña aledaño a la autopista entre Barinas y Acarigua), Lara (aledaños a la carretera Barquisimeto-Quibor), Anzoátegui (aledaños a la autopista entre Complejo criogénico de José y Barcelona), Zulia (aledaños a la autopista entre Mene Grande y Lagunillas) y Amazonas (zonas aledañas a Puerto Ayacucho). Así mismo en el presente trabajo fueron utilizadas cepas de actinomicetos aisladas tanto en Francia (Pierrelaye), como en África (Burkina Faso). Las cepas de origen clínico provienen de: El Laboratorio de Micología Fundamental y Aplicada del Laboratorio de Actinomicetos patógenos y del

suelo de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela; del Instituto Nacional de Higiene, Departamento de Micología, Caracas, Venezuela; del Observatorio Francés de Nocardiosis (OFN), Lyon, Francia y del Instituto de Medicina Tropical de São-Paulo, Sección de Micología, Brasil.

*Identificación de las cepas:* Las cepas evaluadas fueron identificadas y confirmadas previamente, trabajo reportado por Uzcátegui-Negrón y col. [16]. La confirmación se realizó a nivel de especie, utilizando el secuenciamiento del gen 16S ARNr [17].

*Actividad antifúngica:* La actividad antifúngica se evaluó mediante los métodos de difusión en agar (cilindros de agar y difusión en pozos) utilizando los siguientes medios de cultivo: casitona (Bacto casitone 9 g/L (Difco Laboratorios, Sparks, USA), extracto de levadura 5 g/L (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), citrato de sodio 10 g/L (Prolabo, Paris, Francia), glucosa 20 g/L (Merck), y agar 18 g/L (Merck) y el medio YMA (yeast nitrogen base 6,5 g/L (SIGMA), asparagina 1,5 g/L (Prolabo), glucosa 10 g/L (Merck), y agar 20 g/L (Merck) [9]. Las zonas de inhibición del crecimiento fúngico se midieron en mm. Las cepas de referencia utilizadas fueron: *Fusarium oxysporum* DSM 62318, *Trichophyton rubrum* CIP 2043.92, *Aspergillus fumigatus* DSM 819, *Aspergillus niger* DSM 1957, *Candida albicans* ATCC 10231.

*Método de cilindros de agar:* Las cepas de actinomicetos se cultivaron en agar Bennett. Los aislados clínicos se incubaron a 37 °C y los aislados de suelos a temperatura ambiente por 4 días. Se realizaron los cilindros de agar (perforador calibrado 3 mm de diámetro), se colocaron sobre los medios casitona y YMA suplementados previamente con cada organismo blanco. Las placas se incubaron a 4 °C por 4 horas y luego a 37 °C y 28 °C respectivamente [9]. Los diámetros de inhibición fueron determinados después de 24 horas para las levaduras y después de 48 horas para los hongos filamentosos.

*Método de difusión en pozos:* Los aislados de origen clínico se sembraron en 5 mL de medio líquido Bennett durante 4 días a 37 °C y los del suelo a temperatura ambiente. En los medios de gelosa casitona y YMA que contenían el microorganismo blanco se inocularon en cada pozo 20 µL de los actinomicetos. Las placas se incubaron a 37 °C y 28 °C respectivamente [9].

*Actividad antibacteriana:* La actividad antibacteriana se determinó empleando ambos métodos de difusión y se utilizó como medio de cultivo el agar Müeller-Hinton (Merck). Las zonas de inhibición bacteriana se midieron en mm. Se realizaron las suspensiones de cada una de las bacterias blanco, ajustándolas al patrón 0,5 de McFarland [9]. La actividad se comprobó contra *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa*

ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 19431 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

**Selección del medio de cultivo para el proceso de fermentación:** Las cepas de actinomicetos que presentaron algún tipo de actividad en la etapa del tamizado anterior fueron seleccionadas para optimizar las condiciones de ensayo, en los medios de fermentación: el Medio M1 (Bennett) cuya composición es: caseína 2 g; extracto de carne 1 g; extracto de levadura 1 g; glucosa 10 g; agua destilada 1 litro, pH 7,2. El Medio M2: dextrosa 4%; peptona proteasa 0,9%; extracto de levadura 0,1%; CaCO<sub>3</sub> 0,6%; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1%; MgSO<sub>4</sub> x7H<sub>2</sub>O 0,1%; pH 7,2 [18]. Y el M3 utilizado fue el medio de cultivo Yeast extract-Malt extract-Dextrose (YMD): 0,4% extracto de levadura, 1% extracto de malta, 0,4% dextrosa, 0,2% carbonato de calcio [13,14]. Este medio fue suplementado con 0,5% de tirosina, 0,5% de peptona y 0,5% de oxalato de amonio a pH 7,2 [12]. Para el proceso de fermentación se realizó un pre-cultivo con las cepas de actinomicetos seleccionadas en medio líquido Bennett e incubadas a 37 °C por 48 horas. Luego se inocularon aseptícamente cada fiola (volumen final de 250 mL), con el 10% del cultivo puro de cada cepa a evaluar, se realizó por duplicado en los medios de fermentación (M1, M2 y M3). Las fiolas fueron incubadas a 30 °C, pH 7,2 previamente ajustado, en agitación constante con una velocidad de 250 rpm durante un período de incubación de 5 días.

**Evaluación de la actividad antimicrobiana vs. la edad del cultivo y los patrones de crecimiento de cepas de *Nocardia* sobre los medios de cultivos M1, M2 y M3:** En esta fase se seleccionaron específicamente 22 cepas de actinomicetos que presentaron mayor actividad inhibitoria (tamaño del halo de inhibición) contra la mayoría de los microorganismos blanco en el tamizado anterior. Los tres medios de cultivo (M1, M2 y M3) se analizaron en función de la capacidad biosintética de cada cepa, en un período de incubación de 10 días a una temperatura de 30 °C, 250 rpm y pH 7,2. Se determinó la biomasa, tomándose una alícuota de 5 mL cada día en función del peso seco obtenido y se expresó en mg/100 mL y se midió la actividad antimicrobiana entre el pozo donde se encontraba la cepa de actinomiceto y la periferia del halo de inhibición producida [13]. En esta fase se anexaron dos cepas de levadura: *C. tropicalis* ATCC30658, *C. glabrata* ATCC 90030.

## Resultados

**Actividad antifúngica y antibacteriana:** La actividad antifúngica y/o antibacteriana se determinó por la medición de la zona del halo de inhibición (Tablas 1 y 2). El método que mostró mayor efectividad fue el de cilindros de agar en el medio de cultivo Casitona para los hongos y en el medio de Muller Hinton para las bacterias. Se seleccionaron 34 cepas (11,3%) en función a su actividad inhibitoria contra al menos uno de los organismos probados (hongos filamentosos, levaduras y bacterias). La actividad

Tabla 1. Actividad antifúngica de las cepas de *Nocardia* y *Rhodococcus* de origen clínico.

Cepa	<i>C. tropicalis</i> ATCC 30658	<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>A. niger</i> DSM 1957	<i>A. fumigatus</i> DSM819	<i>T. rubrum</i> DSM654	<i>F. oxysporum</i> DSM62318
<i>N. farcinica</i> PN7M2S	16*	16	19	20	-	-	30
<i>N. otitidiscaviarum</i> PC83M1S	25	16	19	25	40	25	40
<i>R. ruber</i> PN47M2S	15	15	25	18	25	15	-
<i>N. asteroides</i> E1M2S	13	16	16	30	25	35	-
<i>N. brasiliensis</i> 785M2T	-	-	18	25	-	25	30
<i>N. brasiliensis</i> PC100M2S	17	12	-	-	12	30	-
<i>N. brasiliensis</i> 787M1S	10	8	-	25	18	-	-
<i>N. otitidiscaviarum</i> PN4M2S	14	-	-	11	20	-	-
<i>R. rhodochrous</i> PN62M2S	15	11	-	13	26	-	-
<i>N. asteroides</i> PC116M1S	12	10	20	10	25	-	-
<i>N. cerradoensis</i> PC92M2S	-	25	-	14	20	30	-
<i>N. nova</i> PC121M1S	22	16	-	10	23	40	-

\*: halos de inhibición medidos en mm.

antifúngica y/o antibacteriana se vio reflejada en 9 (5,5%) cepas aisladas del suelo y 25 (18,5%) cepas de origen clínico en las especies del género *Nocardia*: *N. brasiliensis*, *N. otitidiscaviarum*, *N. transvalensis*, *N. rhamnosiphila*, *N. wallacei*, *N. cerradoensis*, *N. farcinica* y *N. asteroides*; del género *Rhodococcus* (*R. ruber* y *R. rhodochrous*); y en el caso de *Streptomyces* sólo se utilizaron las cepas identificadas a nivel de género.

**Selección de medios de cultivo para el proceso de fermentación:** Se seleccionaron las cepas de *Nocardia* y *Rhodococcus* (22 cepas) y según los patrones de crecimiento se observó que la mayor producción de metabolitos bioactivos se presentó en 15 cepas clínicas (67%) y del suelo sólo en 7 (33%), siendo estas cepas las que presentaron la mejor actividad antifúngica y/o antibacteriana. El medio de fermentación M2 presentó el mayor rendimiento tanto en la producción de metabolitos secundarios como de biomasa. El medio YMD (M3) favoreció sólo la producción de biomasa y en el medio Bennett (M1) no se observó producción de metabolitos bioactivos ni de biomasa por parte de las cepas (Figura 1).

Tabla 2. Actividad antibacteriana de las cepas de *Nocardia* y *Rhodococcus* de origen clínico.

Cepa	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	<i>E. cloacae</i> ATCC13047	<i>E. faecalis</i> ATCC19431
<i>N. farcinica</i> PN7M2S	21*	17	30	22	30
<i>N. otitidiscaviarum</i> PC83M1S	20	14	-	-	-
<i>R. ruber</i> PN47M2S	27	12	15	19	-
<i>N. asteroides</i> E1M2S	21	16	-	19	-
<i>N. brasiliensis</i> 785M2T	50	-	-	23	-
<i>N. brasiliensis</i> PN100M2S	10	-	-	-	-
<i>N. nova</i> PC121M1S	12	-	12	-	18
<i>N. cerradoensis</i> PC92M2S	18	-	11	-	11
<i>R. rhodochorus</i> PN62M2S	11	10	-	-	36
<i>N. asteroides</i> PC116M1S	15	-	-	-	14
<i>Rhodococcus</i> spp PN81M2	11	-	-	-	11

Solvente: acetato de etilo.

\*: Halos de inhibición medidos en mm.

En esta etapa, las especies de origen clínico *N. brasiliensis* y *N. mexicana*, expresaron actividad antifúngica desde las 24 horas hasta después de las 168 horas de incubación y mostraron ser activas contra *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *A. niger*, *A. fumigatus* y *T. rubrum*. Así mismo, a partir del tercer día de incubación (48 horas) la actividad

antifúngica se observó en cepas de *N. otitidiscaviarum* y *N. nova*, contra *C. albicans*, *C. glabrata*, *A. niger*, *A. fumigatus* y *T. rubrum*; *N. nova* presentó el mismo espectro de acción contra las tres levaduras y sólo contra *A. niger*. Luego de las 72 horas de incubación la especie *N. cerradoensis* fue activa contra *C. glabrata*. La *N. cyriacigeorgica* presentó actividad a las 96 horas de incubación contra *C. glabrata*, *A. niger* y *A. fumigatus*. Sólo la cepa de *N. asteroides* (PC116) mostró actividad a partir de las 168 horas (7 días), contra *C. albicans* y *A. niger*. En las especies de *R. ruber* y *R. rhodochorus* se presentó la actividad después de las 96 horas y se mantuvo hasta las 168 horas de incubación, mostrando un espectro de acción contra *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *A. niger* y *A. fumigatus* (Tabla 1 y figura 2).

De las especies que provenían del suelo, las cepas de *N. cyriacigeorgica* presentaron actividad antifúngica a partir de las 72 horas en adelante (3 días) contra *C. glabrata*, *A. niger* y *A. fumigatus*. *Nocardia* spp. luego de las 24 horas contra *C. glabrata* y contra *C. tropicalis* y después de las 48 horas contra *T. rubrum* manteniéndose hasta el día siete (168 horas).

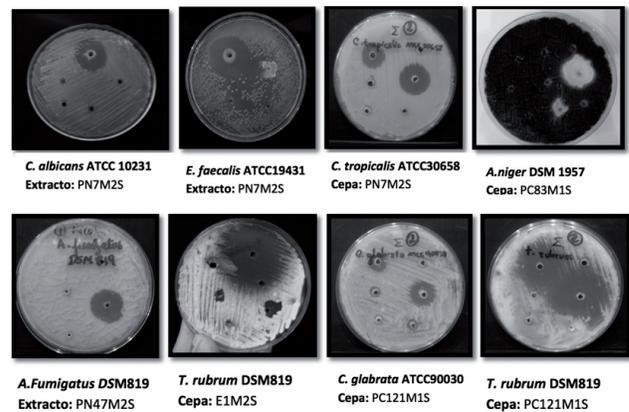


Figura 2. Actividad antimicrobiana de cepas de *Nocardia* y *Rhodococcus* de origen clínico.

Discusión

En la primera etapa del tamizado la moderada a baja actividad antifúngica y antibacteriana en el método de difusión cilindros de agar y en los medios de cultivo Casitona y el Müeller Hinton, difieren con los obtenidos por Lemriss et al. [9], quienes reportan el mayor rendimiento con el método de difusión en pozos y el medio de cultivo YMA para los hongos. Sin embargo, hubo coincidencia cuando se utilizó el método de cilindros de agar en el medio Casitona en la actividad contra *A. fumigatus*, *A. niger*, *F. oxysporum* y *C. albicans*. La actividad antimicrobiana se reportó en especies de los géneros *Nocardia* y *Rhodococcus*, de origen clínico (18,5%), presentando mayor actividad antimicrobiana las cepas *N. brasiliensis* y la *N. otitidiscaviarum*, especies patógenas más comunes en Venezuela, sin embargo, en las cepas del suelo se observó la actividad en especies que no habían sido reportadas en el país con anterioridad, como son: *N. wallacei*, *N. transvalensis* y *N. rhamnosiphila*.

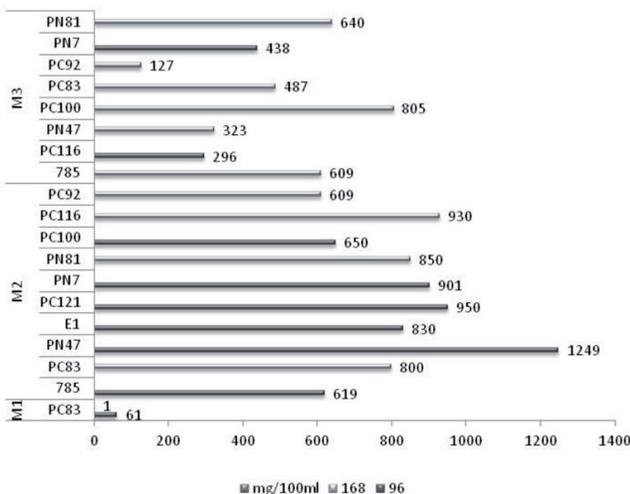


Figura 1. Comparación de biomasa, medios de cultivo utilizados y tiempo de observación.

La *N. rhamnosiphila*, es una especie que ha sido aislada sólo a partir de suelo y la *N. wallacei* (*N. asteroides* Tipo IV) es una nueva especie ubicada dentro del complejo *N. transvalensis* que ha sido reportada en muestras clínicas y se presenta como resistente a la amikacina [19,20], sin embargo, en este estudio esta especie fue aislada del suelo. Estos resultados muestran a especies de *Nocardia* de reciente reporte en Venezuela como productoras de metabolitos bioactivos. Si bien, en la mayoría de los trabajos que se han realizado en otras investigaciones, se evidencia la expresión de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana en actinomicetos aislados principalmente del suelo y en muy baja frecuencia en aislados clínicos [9,18,21-23] los resultados del presente estudio, indican que las cepas de actinomicetos de origen clínico son fuentes de metabolitos secundarios con actividad antifúngica y/o antibacteriana.

Así mismo, los patrones de crecimiento y los perfiles antimicrobianos evaluados en 22 cepas de actinomicetos sobre los tres medios de cultivo líquido, mostraron que el medio de fermentación M2 fue el óptimo para la producción de biomasa y metabolitos bioactivos contra todas las levaduras y hongos filamentosos y bacterias. La producción de sustancias antibióticas ha sido investigada por varios autores [13-15] donde utilizan distintas fuentes que favorecen la obtención de metabolitos antimicrobianos. La composición del medio M2 utilizado en el presente trabajo, corresponde a las fuentes optimizadas por Kavitha y Vijayalakshmi [13] en el estudio realizado por estos autores, para aumentar la producción de metabolitos bioactivos de *N. levis* MK-VL\_113 [14]. Otros investigadores utilizaron un medio de fermentación con la misma composición empleada en este trabajo y lograron obtener un compuesto bioactivo de *Streptomyces* sp. ANU6277 con fuerte actividad contra bacterias grampositivas y gramnegativas, y contra *C. albicans*, *A. niger* pero no contra *A. fumigatus* [24-25]. Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron que la habilidad de los microorganismos para producir antibióticos no es una característica constante, sino que puede ser incrementada o completamente disminuida, dependiendo de las condiciones en las cuales ellos crecen, es decir, la producción de la biomasa y de metabolitos bioactivos se vió favorecida de manera particular cuando se utilizó el medio M2 el cual contenía fuentes específicas de carbono como la sacarosa, de nitrógeno como la peptona y el oxalato de amonio y minerales como el  $K_2HPO_4$  [14,25].

De la misma manera, cuando se evaluó la actividad antifúngica y antibacteriana en un período de 10 días de incubación, fue muy variable en las especies de *Nocardia* y *Rhodococcus*. Kavitha *et al.* presentaron diferentes perfiles de actividad para especies de *Streptomyces* y *Nocardia*, entre los días 4 y 5 y utilizaron como medio de producción el caldo YMD [14]. Por el contrario, para *S. albidoflavus* PU23 y *Actinomadura* sp. AC104 los metabolitos fueron colectados a los 7 y 8 días respectivamente, los mismos mostraron una excelente actividad antifúngica contra hongos filamentosos y levaduras [19, 26]. El presente estudio permitió determinar la capacidad biosintética y la fase de crecimiento en que se

producen las sustancias bioactivas en las cepas de *Nocardia* y *Rhodococcus* evaluadas, demostrando la variabilidad que existe en la producción metabólica de cada cepa en particular.

Estos resultados sugieren que la selección y estandarización de los medios de producción y las condiciones de incubación empleados, provee un rendimiento mayor de la actividad en las cepas de origen clínico (67%) y en menor grado en las cepas de origen ambiental (33%). En este caso, el amplio espectro de acción que presentaron las especies del género *Nocardia* y *Rhodococcus*, señalan a estas cepas como prometedoras para la búsqueda de metabolitos secundarios de naturaleza antifúngica y antibacteriana. Se concluye que los actinomicetos de origen clínico son una fuente especialmente interesante para la búsqueda de metabolitos bioactivos contra patógenos resistentes a las drogas que son utilizadas clínicamente. El presente estudio se inició con la búsqueda de cepas de actinomicetos productoras de sustancias antimicrobianas. Estas investigaciones se continuarán, con la purificación y posterior caracterización de los extractos metabólicos obtenidos por medio de la utilización de métodos químicos analíticos, tales como: cromatografía de capa fina, espectro UV-visible, infrarrojo y HPLC-MAAs. La aplicación de estos métodos permitirá la elucidación de la estructura química de las moléculas obtenidas de los extractos purificados, de las cepas de los actinomicetos estudiados en el presente trabajo.

### Agradecimientos

A los laboratorios que aportaron las cepas para la realización de este estudio. Se agradece al CDCHTA por el apoyo económico por medio del proyecto CDCHTA N° FA-445-08-03-AA.

### Referencias

1. Anupama M, Narayana KJ, Vijayalakshmi M. Screening of *Streptomyces purpeofuscus* for antimicrobial metabolites. Res J Microbiol. 2007; 2:992-4.
2. Van Wezel GP, McKenzie NL, Nodwell JR. Applying the genetics of secondary metabolism in model actinomycetes to the discovery of new antibiotics. Methods Enzymol; 2009 ; 458:117-41.
3. Omura S, Tanaka H. Production, structure and antifungal activity of polyene macrolides. In: Macrolide antibiotics: Chemistry, biology and practice. Omura S, editor. New York: Academic Press; 1984. p 351-404.
4. Butter MS. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical. Nat Prod Rep. 2008; 25:475-516.
5. Fiedler HP, Bruntner C, Bull AT, Wards MG, Potterat O, Puder C, Mihm G. Marine actinomycetes as source of novel secondary metabolites. Antonie Van Leeuwenhoek. 2005; 87:37-42.
6. Norlan RD, Cross T. Isolation and screening of actinomycetes. In: Goodfellow M, Williams ST, Mordarski M., editors. Actinomycetes in biotechnology. London: Academic Press; 1988. p 1-32.

7. Miyadoh S. Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: producing microorganisms approach. *Actinomycetologica*. 1993; 7:100-6.
8. Barakate M, Ouhdouch Y, Oufdou KH, Beaulieu C. Characterization of rhizospheric soil *Streptomyces* from Moroccan habitats and their antimicrobial activities. *World J Microbiol Biotech*. 2002; 18:49-54.
9. Lemriss S, Laurent F, Couble A, Casoli E, Lancelin JM, Saintpierre D, Rifai S, Fassouane A, Boiron P. Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Can J Microbiol*. 2003; 49:669-74.
10. León J, Aponte JJ, Rojas R, Cuadra DL, Ayala N, Tomás G, Guerrero M. Estudio de actinomicetos marinos aislados de la costa central del Perú y su actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes y *Enterococcus faecalis* vancomicina resistentes. *Rev Peru Med Exp Salud Pub*. 2011; 28:237-46.
11. Baltz RH. Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Curr Opin Pharmacol*. 2008; 8:557-63.
12. El-Gendy MM, Hawas UW, Jaspars M. Novel Bioactive Metabolites from a Marine Derived Bacterium *Nocardia* sp. ALAA 2000. *J Antibiot*. 2008; 61:379-86.
13. Kavitha A, Prabhakar P, Narasimhulu M, Vijayalakshmi M, Venkateswarlu Y, Venkateswara D, Subba-Raju VB. Isolation, characterization and biological evaluation of bioactive metabolites from *Nocardia lewis* MK-VL\_113. *Microbiol Res*. 2009; 8:1-12.
14. Kavitha A, Vijayalakshmi M, Sudhakar P, Narasimha G. Screening of Actinomycete strains for the production of antifungal metabolites. *Afr J Microbiol Res*. 2010; 4:27-32.
15. Thenmozhi M, Kannabiran K. Studies on isolation, classification and phylogenetic characterization of novel antifungal *Streptomyces* sp. VITSTK7 in India. *Curr Res J Biol Sci*. 2010; 2:306-12.
16. Uzcátegui-Negrón M, Serrano JA, Boiron P, Rodriguez-Nava V, Couble A, Delphine M, Sanchez Herrera K, Sandoval H, Reviakina V, Panizo M, Mendoza M. Clasificación e identificación de especies de actinomicetos: un estudio fenotípico comparativo. *Rev Soc Ven Microbiol*. 2009; 29:91-7.
17. Uzcátegui-Negrón M, Serrano JA, Boiron P, Rodriguez-Nava V, Couble A, Delphine M, Sanchez Herrera K, Sandoval H, Reviakina V, Panizo M, Mendoza M. Reclassification by molecular methods of actinobacteria strains isolated from clinical cases in Venezuela. *J Mycol Med*. 2011; 21:100-5.
18. Kavitha A, Vijayalakshmi M. Studies on cultural, physiological and antimicrobial activities of *Streptomyces rochei*. *J Appl Sci Res*. 2007; 3:2026-9.
19. Everest GJ, Cook AE, LeRoes-Hill M, Meyers PR. *N. rhamnosiphila* sp. nov., isolated from soil. *Syst Apply Microbiol*. 2011; 34:508-12.
20. Conville PS, Brown JM, Steingerwalt AG, Brown- Elliot BA, Witebsky FG. *N. wallacei* sp. nov. and *Nocardia blacklockiae* sp. nov, human pathogens and members of the «*Nocardia transvalensis* Complex». *J Clin Microbiol*. 2008; 46:1178-84
21. Aly MM, Al-aidroos BA, Alfassi FA. Production of non polyenic antifungal agent from *Streptomyces* sp. BM54, isolated from marine shrimps. *Crown J Med*. 2011; 1:1-8.
22. Badji B, Zitouni A, Mathieu F, Lebrihi A, Sabaou N. Antimicrobial compounds produced by *Actinomadura* sp. AC104 isolated from an Algerian Saharan soil. *Can J Microbiol*. 2006; 52:373-82.
23. Anibou M, Chait A, Ziad A, Taourirt M, Ouhdouch Y, Benherref A. Actinomycetes from Moroccan habitats : isolation and screening for cytotoxic activities. *World J Microbiol Bio*. 2008; 24:2019-25.
24. Baltz RH. *Streptomyces* and *Saccharopolyspora* hosts for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2010; 37:759-72.
25. Narayana KJP, Prabhakar P, Vijayalakshmi M, Venkateswarlu Y, Krishna PS. Study on bioactive compounds from *Streptomyces* sp. ANU 6277. *Pol J Microbiol*. 2008; 1:35-9.
26. Augustine SK, Bhausar SP, Kapadnis BP. A non-polyene antifungal antibiotic from *S. albidoflavus*. *J Biosci*. 2005; 30:201-11.