



**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y
BIOLÓGICAS**
CARRERA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA MARINA

**“Actividad multienzimática y evaluación antibacteriana de
estreptomycetos marinos de la Bahía Maxwell, Antártica”**

Tesis para optar el título profesional de:

BIÓLOGA MARINA

Presentado por:

Krystel Susaya Vicente (0000-0003-2106-8576)

Asesor:

Wilbert Serrano Huiñocana (0000-0001-7133-2895)

Lima – Perú

2021

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Lima, 29 de noviembre 2021.

Los integrantes del Jurado de tesis:

Presidente: Blga. Rocío del Pilar Retamozo Chávez
Miembro: Blga. Roxana Noemi Rodríguez Vial
Miembro: Blgo. Mirko David Lino Navarro

Se reúnen para evaluar la tesis titulada:

“ACTIVIDAD MULTIENZIMÁTICA Y EVALUACIÓN ANTIBACTERIANA DE ESTREPTOMYCETOS MARINOS DE LA BAHÍA MAXWELL, ANTÁRTICA”

Presentada por la/el estudiante/bachiller:

- **Krystel Susaya Vicente**

Para optar el Título Profesional de Bióloga Marina

Asesorado por: Dr. Wilbert Serrano Huiñocana

Luego de haber evaluado el informe final de tesis y evaluado el desempeño del estudiante de la carrera de Biología Marina en la sustentación, concluyen de manera unánime (x) calificar a:

Tesis: Krystel Susaya Vicente			Nota (en letras): 16 (dieciséis)
Aprobado ()	Aprobado - Muy buena (<input checked="" type="checkbox"/>)	Aprobado - Sobresaliente ()	Desaprobado ()

Los miembros del jurado firman en señal de conformidad.



Blga. Rocío del Pilar Retamozo Chávez
Presidente



Blga. Roxana Noemi Rodríguez Vial
Miembro 1



Blgo. Mirko David Lino Navarro
Miembro 2



Dr. Wilbert Serrano Huiñocana
Asesor

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer a mi mamá por todo el apoyo brindado a lo largo de estos años, a mi familia por su constante soporte y ánimos.

Agradezco a mis asesores Wilbert y Ulrike por su tiempo, conocimientos y guiarme en la correcta elaboración del trabajo, así como su rigurosidad para revisarlo.

Asimismo, quiero agradecer a todos los integrantes del Laboratorio de Microbiología Molecular y Genómica Bacteriana de la Universidad Científica del Sur, en especial al biólogo y amigo, Raúl Olaechea, por su constante guía, paciencia y recomendaciones durante el desarrollo experimental.

De la misma forma, agradezco a Luis Cerpa Cornejo, miembro del Instituto Geológico Minero y Metalúrgico del Perú, a la profesora Báslavi Córdor Luján, a Noelia Kandratavicius y Marcel Rodríguez, investigadores en la facultad de Ciencias de la Universidad de la República (Uruguay) por la colecta de las muestras y toma de datos del ANTAR XXV.

A Antonio Calderón, mi mejor amigo, por su constante soporte emocional durante la realización del presente proyecto de tesis y a todos mis amigos que me aclararon ciertas dudas y me facilitaron información.

Finalmente, agradecer a la Universidad Científica del Sur por el apoyo financiero, a través del concurso “Fondo Semilla 2019” para la realización de esta tesis.

INDICE

Caratula.....	1
Acta de Sustentación de tesis.....	2
Agradecimiento.....	3
Resumen.....	5
Abstract.....	6
Introducción.....	7
Materiales y Métodos.....	9
- Área de muestreo.....	9
- Pre-tratamiento.....	10
- Aislamiento de Actinomicetos.....	10
- Identificación Molecular.....	12
o Extracción de ADN.....	12
o Amplificación por PCR y Secuenciamiento.....	12
o Ensamblaje de secuencias y análisis filogenético.....	14
- Caracterización Cultural y morfológica.....	15
- Utilización de carbohidratos y caracterización bioquímica.....	15
- Evaluación de actividad enzimática.....	16
- Evaluación de la actividad antibacteriana.....	16
Resultados.....	17
- Aislamiento de actinomicetos.....	17
- Identificación molecular y análisis filogenético.....	17
- Caracterización cultural y morfológica.....	20
- Evaluación de utilización de carbohidratos y caracterización bioquímica.....	23
- Evaluación de actividad enzimática.....	26
- Evaluación antibacteriana.....	29
Discusión.....	30
Referencias Bibliográficas.....	37
Anexos.....	48

Resumen

El presente estudio tiene como objetivo evaluar la producción de enzimas extracelulares y actividad antibacteriana de estreptomicetos aislados de sedimento marino de la Bahía Maxwell, Antártica frente a cepas de tipo estándar. Se obtuvo un total de 8 cepas de estreptomicetos, las cuales pudieron degradar distintos sustratos, siendo el almidón y la lecitina los que presentaron los mayores porcentajes de degradación de 59% y 55%, respectivamente. Asimismo, la cepa denominada *Streptomyces* 1 fue la única cepa que presentó actividad antagonista frente a las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 y *Vibrio alginoliticus* ATCC 17749. El presente estudio demuestra el potencial biotecnológico de estreptomicetos marinos aislados de ambientes extremos como la Bahía Maxwell en la Antártida.

Palabras clave: Antártica, estreptomicetos marinos, actividad enzimática, antagonismo

Abstract

The present study was aimed to evaluate the production of extracellular enzymes and antibacterial activity of actinomycetes isolated from marine sediment from Maxwell Bay, Antarctica against standard strains. A total of 8 marine *Streptomyces* were isolated in pure culture and showed enzymatic activity to degrade different substrates, among them starch and lecithin with a percentage of 59% and 55%, respectively. Likewise, the strain named *Streptomyces* 1 showed important antagonist activity against type strains *Escherichia coli* ATCC 259-22, *Staphylococcus aureus* ATCC 259-23, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 and *Vibrio alginoliticus* ATCC 17749. This study demonstrates the promising biotechnological use of marine *Streptomyces* strains isolated in extreme environments such as Maxwell Bay, Antarctica.

Key words: Antarctic, marine *Streptomyces*, enzymatic activity, antagonism.

Actividad multienzimática y evaluación antagonista de estreptomicetos marinos de la Bahía Maxwell, Antártica

Multienzymatic activity and antagonist evaluation of marine *Streptomyces* from Maxwell Bay, Antarctica

^{1,2} Krystel Susaya Vicente, ²Wilbert Serrano, ²Ulrike Tarazona-Janampa & ²Raul M. Olaechea

¹Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas. ²Laboratorio de Microbiología molecular y genómica bacteriana. Universidad Científica del Sur, Lima, Perú.
krystel.susaya@gmail.com

Introducción

El continente antártico presenta condiciones ambientales únicas que lo diferencian de otros biomas, entre estos, la temperatura extremadamente baja, vientos intensos, clima seco, radiación constante durante la temporada de verano (Quintana et al., 1995; Camacho & Fernández, 2005). Aunque estos factores abióticos limitan el crecimiento y desarrollo de diversos organismos eucariotas (González, 2014), las comunidades de microorganismos, principalmente procariotas, han podido desarrollar características genotípicas y fenotípicas únicas para adaptarse a estas condiciones, favoreciendo su evolución y obteniendo la capacidad de generar compuestos de interés biotecnológico (Nichols et al. 2002, Giordano et al. 2012).

Entre los microorganismos procariotas encontrados en este continente se tiene a los actinomicetos, estos organismos se distribuyen en los diferentes biotopos antárticos tales como suelos, lagos y ambientes marinos (Lee et al. 2012, Encheva-Malinova et al. 2014, Navas 2016). Dentro de los actinomicetos, se tiene al género *Streptomyces*, organismos de gran interés para la industria biotecnológica debido a su capacidad para producir

metabolitos secundarios variados, siendo comúnmente utilizados para la producción compuestos importantes en farmacología como antibióticos, antitumorales, e industriales como las enzimas (Fernández et al. 2015, Weber et al. 2015, Quiñones-Aguilar et al. 2016, Kamjam et al. 2017). Por otro lado, la búsqueda de compuestos biológicos amigables con el medio ambiente como las enzimas son muy importantes debido a que pueden reemplazan a los catalizadores químicos en la fabricación de productos alimenticios, químicos, textiles, entre otros (Zhang & Kim 2012, Prakash et al. 2013), evitando de esta manera la generación de residuos tóxicos que terminar en los cuerpos de agua (Sengul & Gurel 1993, Amat et al. 2005). Asimismo, la resistencia a los antibióticos de diferentes cepas clínicas representa un problema creciente para la salud pública, por lo que también existe la necesidad de encontrar compuestos antimicrobianos novedosos que tengan la capacidad de controlar y eliminar estos microorganismos (Suarez et al. 2012, World Health Organization 2014).

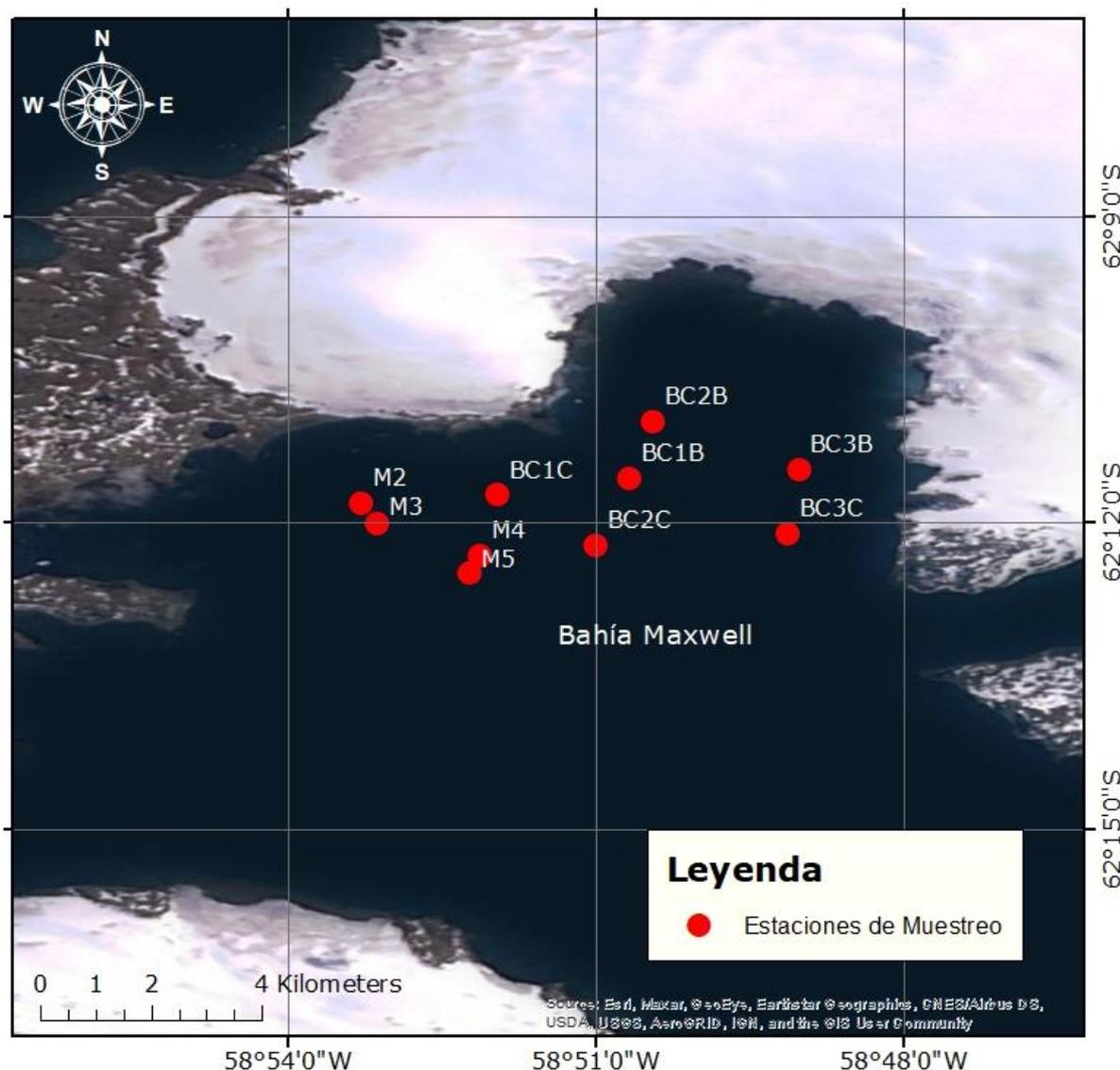
El presente trabajo tiene como principal objetivo evaluar la producción de enzimas extracelulares y actividad antibacteriana de cepas de estreptomicetos marinos aislados de muestras de sedimento colectadas de distintas estaciones en la Bahía Maxwell, Antártica.

Materiales y Métodos

Área de muestreo

Las muestras fueron colectadas en el marco de la expedición peruana a la Antártica ANTAR XXV dentro del proyecto “Caracterización de la materia orgánica particulada en Bahía Maxwell en sedimento y agua: implicancias en la distribución bentónica”, liderado por el INGEMMET, durante el verano austral en febrero del 2018. Se colectaron 10 muestras de sedimento marino en diferentes estaciones fijas de la Bahía Maxwell (Fig 1). Para ello, se empleó el método del dragado, utilizando una draga Van Veen de 0.05 m² de área. De las muestras de sedimento colectadas se tomaron porciones de la zona menos alteradas utilizando una espátula estéril en un tubo cónico estéril de 50 ml. Los tubos con las muestras colectadas se mantuvieron en congelación a -80 °C en la base de investigación Machu Picchu para posteriormente ser transportadas hasta el laboratorio de Microbiología Molecular y Genómica Bacteriana de la Universidad Científica del Sur.

Estaciones de muestreo en Bahía Maxwell - Antártida



Estación	Profundidad (m)	Longitud	Latitud
BC2B	92.1	62°11'00,12" S	58°49'86.12" W
BC1C	141.3	62°11'43,50" S	58°51'56.77" W
M3	202	52°11'60,05" S	58°52'67.01" W
BC1B	64	62°10'93.83" S	58°49'99.89" W
BC3B	84.4	62°11' 28,49" S	58°48'60.78" W
BC3C	129	62°12'06,38" S	58°49'07.24" W
M5	246	62°11'89,67" S	58°51'73.34" W
BC2C	216	62°11'72,99" S	58°50'59.43" W
M2	168	62°11'48,16" S	58°53'16.08" W
M4	246	62°11'79,25" S	58°52'07.20" W



Figura 1. Ubicación geográfica de las estaciones de muestreo de sedimento marino de la Bahía Maxwell, Antártica. / Figure 1. Geographic location of marine sediment sampling stations at Maxwell Bay, Antarctica.

Pre-tratamiento

En el laboratorio, con la finalidad de reducir el crecimiento de microorganismos no esporulados, las muestras fueron sometidas a un pre-tratamiento. Con esta finalidad, se pesó 1 gr de muestra de sedimento húmedo en placas Petri estériles y se llevaron a la estufa a 50°C por 60 minutos de acuerdo con León et al. (2007); seguidamente se procedió a realizar el tratamiento de radiación UV durante 30 segundos (Bredholdt et al. 2007). Finalmente, las muestras fueron llevadas a baño maría a 60°C por 30 minutos (Jensen et al. 2005).

Aislamiento de actinomicetos

Las muestras de sedimento pretratadas fueron sometidas a un proceso de dilución seriada de 1 en 10 utilizando solución salina. Luego, de acuerdo a la metodología de Yoke-Kqueen et al. 2015, se tomaron 100 μ L de las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} y se sembraron por el método de diseminación en placas de agar conteniendo los siguientes medios de cultivo: Agar actinomycetes (HIMEDIA), medio GYM (4 g/l glucosa, 4 g/l extracto de levadura, 10 g/l extracto de malta, 2 g/l CaCO_3 y 12 g/l agar), agar almidón-caseína (10 g/l almidón soluble, 1 g/l caseína, 2 g/l K_2HPO_4 , 0.02 g/l CaCO_3 , 0.01 g/l $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g/l NaCl y 18 g/l agar), agar almidón-levadura (10 g/l almidón soluble, 4g/l extracto de levadura, 0.5 g/l K_2HPO_4 , 0.5 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ y 15 g/l de agar), agar R2A (HIMEDIA) y agar marino (1 g/l extracto de levadura, 4 g/l peptona y 15 g/l agar). Todos los medios fueron preparados con agua de mar filtrada y suplementados con un volumen de 140 μ l de ácido nalidíxico (30 μ l/ml) y 560 μ l de cicloheximida (80 μ l/ml), con el objetivo de reducir el crecimiento de otros organismos. Finalmente, las placas fueron incubadas a 30 °C por 3 semanas (Yu et al. 2005). Las presuntas cepas de estreptomicetos fueron replicadas en los medios GYM y Actinomycete

para su posterior purificación y caracterización. Posteriormente, las cepas aisladas fueron almacenadas en ultracongelación a -80°C en el banco de cepas bacterianas de la Universidad Científica del Sur para posteriores estudios.

Identificación Molecular

Extracción de ADN

Las cepas aisladas fueron reactivadas en tubos cónicos estériles de 50 ml utilizando el medio de cultivo líquido GYM y fueron incubadas a 30°C por 7 - 10 días. Una vez que se observó en el medio la cantidad suficiente de biomasa, se procedió a centrifugar a 4500 RPM durante 15 minutos para colectar el pellet y resuspenderlo en PBS 1X (Parada et al, 2017). Posteriormente, se realizó la extracción del ADN genómico mediante el uso del kit de extracción “Bacterial Genomic DNA Isolation Kit” (Norgen, Canadá) siguiendo los protocolos del fabricante.

Amplificación por PCR y secuenciamiento

Se verificó la correcta extracción del ADN genómico mediante electroforesis en gel de agarosa, utilizando el marcador de peso molecular 1kb Lambda Hind III. Luego se procedió a amplificar la subunidad menor del gen ribosomal 16S ARNr mediante PCR, utilizando cebadores universales para bacterias tales como el GM3 forward (5'-AGAGTTTGATCMTGGC-3') y GM4 reverse (5'-TACCTTGTTACGACTT-3') (Muyzer & Corstjens 1993). Para ello, se utilizó 1 μl del ADN genómico, extraído previamente, en 10 μl de DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 1 μl de cada cebador (GM3F y GM4R), 0.1 μl de Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) y 6.9 μl de agua ultrapura para PCR (AccuGENE), para un volumen final de 20 μl .

El proceso de la PCR se llevó en un termociclador Benchmark Scientific utilizando condiciones estándar (Tabla 1. A). Sin embargo, debido a que muchas muestras no se amplificaron utilizando condiciones estándar de PCR, se optó por realizar el método Touch Down (Tabla 1. B), el cual consiste en someter la reacción de PCR a una gradiente de temperatura, disminuyendo 1°C por cada fase de alineamiento (Green & Sambrook, 2018), de la misma forma se cambió el kit de amplificación DreamTaq Green PCR Master Mix por el Maxima Hot Start PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific), que tolera una mayor temperatura de denaturación a 96°C.

Tabla 1. Programas utilizados en el proceso de PCR para la amplificación del gen ribosomal 16S rARN de las cepas de actinomicetos marinos de la Bahía Maxwell /

Programs used in the PCR process for the amplification of 16S RNAr gene of marine actinomycetes strains from Maxwell Bay.

A. Programa convencional PCR			
Fase	T°C	Tiempo (min)	No. Ciclo
Denaturación Inicial	95°C	1	1
Danaturación	95°C	1	
Alineamiento	44°C	1	35
Extensión	72°C	2	
Extensión Final	72°C	3	1
B. Programa touch down PCR			
Fase	T°C	Tiempo (min)	No. Ciclo
Denaturación Inicial	96°C	5	1
Danaturación	96°C	0.3	
Alineamiento	54 - 44°C	0.3	35
Extensión	72°C	3	
Extensión Final	72°C	10	1

La verificación de la amplificación por PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa en 1% en buffer TBE 0.5% a 100 v durante 30 min, para ello se tomaron 2 µl de producto PCR, en 1 µl de loading buffer (Thermo Fisher Scientific) más 2 µl del fluorocromo Safe Green (ABM™, Applied Biological Materials USA), cargando los 5 µl

de cada producto en los respectivos pocillos del gel de agarosa. El tamaño de los productos de la reacción se verificó utilizando el marcador de peso molecular 1Kb (Thermo Fisher Scientific). Finalmente, los productos fueron visualizados en un transiluminador luz led azul (Clever Scientific).

Los productos de la PCR fueron previamente purificados y luego secuenciados mediante el método de Sanger (1975), a través del servicio de secuenciación de la empresa MacroGen Inc (www.macrogen.com) Corea, utilizando 4 cebadores universales para 16S rRNA bacteriano: 27F (AGAGTTTGATCTGGCTCAG), 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) (Lane, 1991), 518F (CCAGCAGCCGCGGTAATACG) y 800R (TACCAGGGTATCTAATCC).

Ensamblaje de secuencias y análisis filogenético

La calidad de las secuencias, el análisis del cromatograma y el ensamblaje de los fragmentos internos del 16S rRNA se realizó utilizando el programa Chromas Pro-7.1 (Technelysium Pty Ltd. Australia). Las secuencias ensambladas fueron comparadas con las secuencias depositadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) Altschul et al. (1990), y la plataforma EZBiocloud (Yoon et al. 2017).

Las secuencias ensambladas conteniendo >1200 bp en formato fasta, fueron alineadas utilizando el programa ClustalX (Larkin et al. 2007) y las partes no alineadas fueron cortadas mediante el software BioEdit (Hall, 1999). Las secuencias completamente alineadas se exportaron al programa MEGA X (Kumar et al. 2018) para la inferencia filogenética, para ello, se utilizó el método de distancia Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei 1987), utilizando el modelo de sustitución de Tajima-Nei (Tajima and Nei 1984). Para el análisis de consenso del árbol recreado se utilizó el método bootstrap con 500

repeticiones, finalmente se consideraron las transiciones y transversiones por defecto. Como grupo externo se utilizó las secuencias de *Micrococcus antarcticus*, *Kocuria polaris* y *Nestereskononia aurantiaca*.

Caracterización cultural y morfológica

Luego de comprobar la identificación filogenética de las cepas aisladas con los actinomicetos del género *Streptomyces*, se llevó a cabo la caracterización morfológica de las mismas siguiendo las instrucciones del compendio de actinobacteria (Wink, 2016). Las cepas fueron sembradas en medios ISP (International *Streptomyces* Project) en donde se evaluaron las características morfológicas de las cepas tales como el crecimiento, esporulación, coloración del sustrato, formación de micelio aéreo y pigmentos difusibles luego de 14 días de crecimiento a 30°C en: agar extracto de levadura y extracto de malta (ISP 2), agar avena (ISP 3), agar almidón-sales inorgánicas (ISP 4), agar de glicerol-asparagina (ISP 5) y agar tirosina (ISP 7) (Shirling & Gottlieb, 1966). Asimismo, mediante tinción Gram (Gram, 1884), se evaluó la pureza de las cepas, observando células filamentosas en el microscopio.

Utilización de carbohidratos y caracterización bioquímica

Se evaluó la capacidad de utilizar 5 diferentes fuentes de carbono en microplacas de 12 pocillos empleando el medio basal 5338 (ISP 9) suplementado con 1% de los siguientes carbohidratos: glucosa, sacarosa, rafinosa, fructosa y manitol (Shirling & Gottlieb, 1966). Se consideró como control positivo el pocillo que contenía glucosa y como control negativo el pocillo que contenía solo el medio basal.

El perfil bioquímico de las cepas se evaluó utilizando los sistemas de identificación microbiano ApiZym y Api Coryne (BioMerieux SA, France). Las pruebas se llevaron a

cabo de acuerdo con las instrucciones de cada kit, incubando las muestras a 30°C por 24 horas.

Evaluación de actividad enzimática

Se evaluó la producción de enzimas extracelulares siguiendo la metodología realizada por Tarazona (2017) y Lamilla et al., (2017) inoculando las cepas en medio marino suplementado con diferentes sustratos: almidón (0.4%), caseína (1%), carboximetilcelulosa (1%), tween80 (1%) y lecitina (1.5%), además de agar DNA. Los medios se prepararon por triplicado y fueron incubados a 30°C por 10 – 14 días. La actividad enzimática se evidenció por la formación de un halo de degradación, el cual fue visualizado directa o indirectamente utilizando un agente revelador como lugol al 1%, azul de lactofenol y rojo de Congo, los cuales fueron añadidos sobre el medio para revelar la actividad de la amilasa, caseinasa y celulasa, respectivamente.

Evaluación de la capacidad antibacteriana

La capacidad inhibitoria de las cepas de estreptomicetos fue evaluada frente a las cepas estándar de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y las cepas patógenas de invertebrados marinos, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 y *Vibrio alginolyticus* ATCC 17749, mediante el método Cross-Streak (Kumar & Bhaskara 2012) con modificaciones. Las cepas de actinomicetos fueron inoculadas en línea recta en placas de agar marino durante 12 días a 30°C. Luego de ello, las cepas testigo fueron llevadas a la escala de McFarland de 0.5 para posteriormente ser estriadas sobre la placa en forma de línea perpendicular e incubarlas durante 24 horas a 30°C (*V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*) y a 37°C (*E. coli* y *S. aureus*). Adicionalmente, se sembraron solo las cepas testigo en placas de agar marino a modo de control de

crecimiento. Finalmente, la capacidad antagonista de los actinomicetos se evaluó mediante la medición de la zona de inhibición.

Resultados

Aislamiento de actinomicetos

En el presente estudio se obtuvieron un total de 8 cepas de actinomicetos del género *Streptomyces* que en su mayoría fueron aisladas de las estaciones BC1C y M3. De los medios empleados, el medio Actinomycete agar mostró mayor efectividad, aislando un mayor número de cepas; asimismo, los medios utilizados para la purificación de las cepas aisladas (GYM y Actinomycete agar) mostraron ser más efectivos al presentar un buen desarrollo del micelio aéreo en los primeros 2 - 3 días a diferencia de los medios de aislamiento primario (almidón-caseína, agar marino y R2A).

Identificación molecular y análisis filogenético

Las cepas se identificaron mediante el análisis de la secuencia de la subunidad menor del gen ribosomal 16S ARNr. Las secuencias de nucleótidos fueron comparadas con las secuencias curadas de la base de datos EZbiocloud para poder determinar el porcentaje de similitud, logrando verificar que todos los aislados pertenecen al género *Streptomyces* (Tabla 2). Sin embargo, solo las cepas denominadas como *Streptomyces* 1 y *Streptomyces* 8, mostraron ser especies distintas y están relacionadas a las especies *Streptomyces badius* y *Streptomyces thermocarboxidus*, respectivamente, mientras que las restantes estarían relacionadas con la especie *Streptomyces daghestanicus* de acuerdo con el porcentaje de similitud de las secuencias de nucleótidos. La inferencia filogenética se determinó en base a la comparación de secuencias del gen 16S ARNr de cepas aisladas en el presente trabajo con secuencias de cepas cercanamente relacionadas

obtenidas de la base de datos EZbiocloud, utilizando el método de distancia Neighbor-Joining (NJ) (Fig. 2).

Tabla 2. Comparación de cepas de estreptomicetos marinos aisladas de la Bahía

Maxwell del presente estudio con secuencias obtenidas de la base de datos

EZbioCloud / Comparison of marine *Streptomyces* strains isolated from Maxwell Bay

in the present study with sequences obtained from the EZbioCloud database.

Cepa aislada	% identidad	Especie más cercana (EzBiocloud)	Nombre de referencia de la cepa	Estación
KRS7 BC1C	100	<i>Streptomyces badius</i>	<i>Streptomyces</i> 1	BC1C
M3(1)	100	<i>Streptomyces daghestanicus</i>	<i>Streptomyces</i> 2	M3
M3(2)	100	<i>Streptomyces daghestanicus</i>	<i>Streptomyces</i> 3	M3
R2A1.1	100	<i>Streptomyces daghestanicus</i>	<i>Streptomyces</i> 4	BC1C
GBC3B	100	<i>Streptomyces daghestanicus</i>	<i>Streptomyces</i> 5	BC3B
GM317	100	<i>Streptomyces daghestanicus</i>	<i>Streptomyces</i> 6	M3
AMBC2C	100	<i>Streptomyces daghestanicus</i>	<i>Streptomyces</i> 7	BC2C
SC2	99.93	<i>Streptomyces thermocarboxydus</i>	<i>Streptomyces</i> 8	BC1C

Caracterización cultural y morfológica

De las 8 cepas aisladas, solo las cepas *Streptomyces* 1 y *Streptomyces* 8 produjeron pigmentos difusibles en tonalidad fucsia y gris, respectivamente, en el medio Actinomycete agar (Fig. 3); asimismo, la cepa *Streptomyces* 8 fue la única que presentó el micelio aéreo en tonalidad grisácea en este medio. Con respecto a las características morfológicas en los medios ISP, se observó el color del micelio aéreo, del sustrato y la producción de pigmentos difusibles luego de 14 días de incubación (Tabla 3). Todas las cepas mostraron crecimiento a partir del 5 día en todos los medios a excepción del medio ISP3, el cual mostró bajo crecimiento y escasa esporulación en todas las cepas; asimismo, la cepa *Streptomyces* 8 mostró baja esporulación en todos los medios ISP. La mayoría de las cepas aisladas mostraron un micelio aéreo en tonalidad blanquecina mientras que en el micelio del sustrato poseían tonalidades amarillentas, verdosas, marrones y naranjas como fue el caso de la cepa *Streptomyces* 1 (Fig. 4). Finalmente, ninguna cepa mostró producción de melanina.

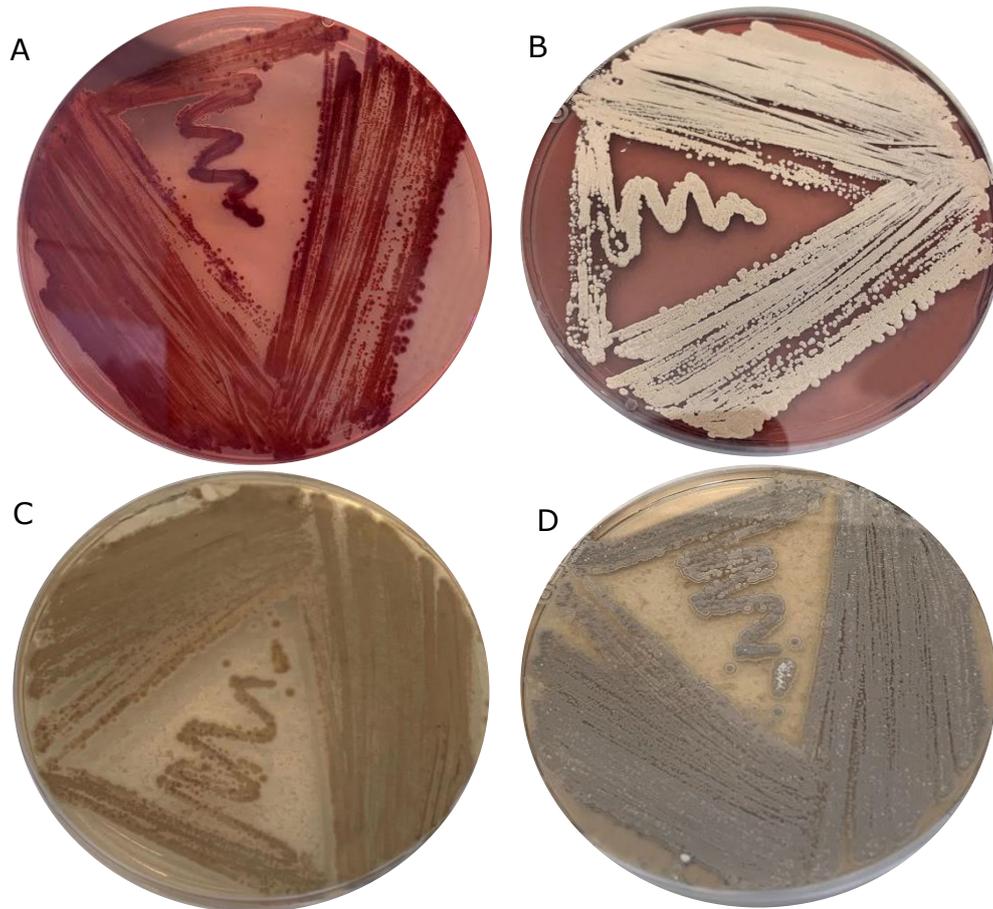


Figura 3. Producción de pigmentos difusibles de las cepas de actinomicetos marinos de la Bahía Maxwell en el medio Actinomycete. A y B. Producción de pigmentos de *Streptomyces* 1 vista desde el lado anverso y reverso, respectivamente. C y D. Producción de pigmentos de *Streptomyces* 8 vista desde el lado anverso y reverso, respectivamente. / Diffusible pigments production of marine actinomycetes strains isolated from Maxwell Bay in Actinomycete media. A, B. Pigment production of *Streptomyces* 1 viewed from the front and back sides, respectively. C, D. Pigment production of *Streptomyces* 8 viewed from the front and back sides, respectively.

Tabla 3. Caracterización morfológica en medios ISP, Actinomycete agar y GYM en función a la cartilla de color RAL-code (<https://www.ralcolor.com/>) de las cepas de estreptomicetos marinos aislados de la Bahía Maxwell, Antártica. / Morphological characterization in ISP, Actinomycete agar and GYM media according to RAL-code color chart of marine *Streptomyces* strains isolated from Maxwell Bay, Antarctic.

Cepa	Medio	Color			Crecimiento	Esporulación
		Micelio Aéreo	Micelio Sustrato	Pigmento soluble		
<i>Streptomyces</i> 1	ISP 2	Blanco crema	Amarillo naranja	Pardo arcilla	+	+
	ISP 3	Blanco perla	Amarillo arena	Pardo ocre	(+)	(-)
	ISP 4	Gris tele 4	Marfil claro	N. P	++	+
	ISP 5	Gris tele 4	Pardo anaranjado	Rosa perlado	++	++
	ISP 7	Blanco perla	Amarillo oro	Amarillo miel	+	++
<i>Streptomyces</i> 2	Actinomycete	Marfil claro	Rojo frambuesa	Rosa viejo	+	++
	GYM	Blanco perla	Amarillo maíz	Pardo arcilla	+	++
	ISP 2	Blanco perla	Beige pardo	Gris oliva	++	+
	ISP 3	Gris guijarro	Verde caña	N. P	(-)	(-)
	ISP 4	Gris seda	Pardo verdoso	Gris caqui	+	(+)
<i>Streptomyces</i> 3	ISP 5	Gris seda	Verde parduzco	Gris oliva	+	+
	ISP 7	Gris seda	Verde parduzco	Gris caqui	(+)	(+)
	Actinomycete	Marfil claro	Amarillo melón	N. P	+	+
	GYM	Marfil claro	Oro perlado	Pardo oliva	+	++
	ISP 2	Blanco perla	Oro perlado	Amarillo miel	+	+
<i>Streptomyces</i> 4	ISP 3	Marfil claro	Beige	Gris beige	(+)	(-)
	ISP 4	Blanco crema	Pardo verdoso	N. P	+	+
	ISP 5	Blanco papiro	Oro perlado	Pardo oliva	(+)	+
	ISP 7	Gris ágata	Gris sombra	Pardo oliva	(-)	+
	Actinomycete	Marfil claro	Amarillo limón	N. P	+	+
<i>Streptomyces</i> 5	GYM	Blanco crema	Verde oliva	Pardo verdoso	++	++
	ISP 2	Gris seda	Pardo ocre	Amarillo narciso	+	+
	ISP 3	Marfil claro	Marfil claro	N. P	(+)	(-)
	ISP 4	Blanco crema	Marfil	N. P	+	(+)
	ISP 5	Gris seda	Beige pardo	N. P	+	++
<i>Streptomyces</i> 5	ISP 7	Gris señales	Pardo corzo	Pardo oliva	+	+
	Actinomycete	Marfil claro	Amarillo azafrán	N. P	+	+
	GYM			N. P	+	+
	ISP 2	Gris guijarro	Gris parduzco	N. P	+	+
<i>Streptomyces</i> 5	ISP 3	Gris seda	Gris amarillento	N. P	(-)	(-)
	ISP 4	Blanco perla	Pardo oliva	N. P	+	+

	ISP 5	Marfil claro	Amarillo oliva	N. P	+	+
	ISP 7	Gris seda	Oro perlado	Amarillo oro	+	+
	Actinomycete	Blanco perla	Amarillo maíz	N. P	+	+
	GYM	Blanco perla	Oro perlado	Pardo verdoso	++	++
<i>Streptomyces</i> 6	ISP 2	Blanco crema	Pardo corzo	N. P	+	+
	ISP 3	Gris seda	Gris amarillento	N. P	(+)	(+)
	ISP 4	Blanco perla	Marfil	N. P	+	+
	ISP 5	Blanco crema	Pardo oliva	N. P	(+)	+
	ISP 7	Marfil claro	Oro perlado	Amarillo arena	+	+
	Actinomycete	Blanco perla	Amarillo azafrán	N. P	++	+
	GYM	Blanco perla	Beige pardo	N. P	+	++
<i>Streptomyces</i> 7	ISP 2	Gris seda	Amarillo oliva	Gris parduzco	+	+
	ISP 3	Blanco crema	Verde caña	N. P	(+)	(-)
	ISP 4	Blanco perla	Pardo pálido	N. P	+	+
	ISP 5	Gris seda	Gris sombra	N. P	(-)	+
	ISP 7	Gris musgo perlado	Marrón señales	Marrón sepia	(+)	+
	Actinomycete	Marfil claro	Amarillo pastel	N. P	+	++
	GYM	Blanco perla	Oro perlado	N. P	+	++
<i>Streptomyces</i> 8	ISP 2	Aluminio blanco	Pardo corzo	N. P	(+)	(+)
	ISP 3	Blanco crema	Marrón tierra	Pardo pálido	(-)	(-)
	ISP 4	Blanco papiro	Pardo corzo	Cobre perlado	(-)	(-)
	ISP 5	Gris tele 1	Pardo corzo	Pardo arcilla	(-)	(+)
	ISP 7	Blanco perla	Pardo corzo	N. P	(-)	(+)
	Actinomycete	Aluminio gris	Gris beige	Gris platino	+	++
	GYM	Gris musgo perlado	Amarillo oliva	Pardo oliva	+	++

Muy bueno, ++; Bueno, +; Medio, (+); Escaso, (-); N. P, No pigmento difusible

Evaluación de utilización de carbohidratos y caracterización bioquímica

La tabla 4 nos muestra las fuentes de carbono utilizadas por las cepas de estreptomicetos. La cepa *Streptomyces* 3 logró utilizar todas las fuentes de carbono y evidenció buen crecimiento. Por otro lado, las cepas *Streptomyces* 4, *Streptomyces* 5 y *Streptomyces* 7 mostraron un excelente crecimiento y esporulación en el medio suplementado con manitol, mientras que las cepas *Streptomyces* 1, *Streptomyces* 6 y *Streptomyces* 7 presentaron las mismas características en el medio suplementado con fructosa; siendo esta última, la única cepa que ha podido tener estas características utilizando 2 fuentes de carbono distintas. Finalmente, las cepas *Streptomyces* 2 y *Streptomyces* 8 mostraron un crecimiento bajo al utilizar como fuente de carbono a la sacarosa.

Tabla 4. Utilización de distintos carbohidratos por parte de las cepas de estreptomicetos marinos aislados de la Bahía Maxwell. / Utilization of different carbohydrates by marine *Streptomyces* isolated from Maxwell Bay.

Cepas	Fuentes de Carbono				
	Glucosa	Manitol	Fructosa	Rafinosa	Sacarosa
<i>Streptomyces</i> 1	-	+	++	(+)	(+)
<i>Streptomyces</i> 2	+	(+)	-	-	-
<i>Streptomyces</i> 3	+	+	+	+	+
<i>Streptomyces</i> 4	+	++	+	+	(+)
<i>Streptomyces</i> 5	+	++	+	(+)	(+)
<i>Streptomyces</i> 6	+	+	++	+	(+)
<i>Streptomyces</i> 7	+	++	++	+	+
<i>Streptomyces</i> 8	-	-	(+)	-	-

+ Buen crecimiento; ++ Mejor crecimiento que el control positivo; (+) Crecimiento menor al del control positivo; - Crecimiento intermedio

Todos los perfiles bioquímicos de las cepas evaluadas se obtuvieron mediante la identificación del sistema API ZYM y API Coryne, los cuales nos han servido para detectar de manera preliminar la actividad enzimática de las cepas.

Todas las cepas presentaron actividad enzimática para la fosfatasa alcalina, arilamidasa de leucina, valina arilamidasa, fosfatasa ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolasa, α -glucosidasa, además de reducir fosfatasa alcalina, D-Glucosidasa e hidrolizar la gelatina. Por otro lado, ninguna de las cepas presentó actividad para cistina arilamidasa, α -galactosidasa, β -glucoronidasa y α -fucosidasa, tampoco pudieron fermentar glucosa, ribosa, xilosa, manitol, maltosa, lactosa, sacarosa y glicógeno.

Tabla 5. Perfil bioquímico de las cepas de estreptomicetos marinos de la Bahía

Maxwell utilizando el sistema de identificación API ZYM / Biochemical profile of marine *Streptomyces* strains from Maxwell Bay using API ZYM system.

Test/ Cepa	Fosfatasa alcalina	Esterasa (C4)	Esterasa Lipasa	Lipasa (C14)	Leucina	Valina arilamidasa	Cisteína	Tripsina	α -quimotripsina	Fosfatasa ácida	Naftol-AS-BI	α -galactosidasa	β -galactosidasa	β -glucoronidasa	α -glucosidasa	β -glucosidasa	N-acetyl- β -D-glucosaminidasa	α -mannosidasa	α -fucosidasa
<i>Streptomyces</i> 1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
<i>Streptomyces</i> 2	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>Streptomyces</i> 3	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>Streptomyces</i> 4	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>Streptomyces</i> 5	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>Streptomyces</i> 6	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>Streptomyces</i> 7	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-
<i>Streptomyces</i> 8	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-

Tabla 6. Perfil bioquímico de las cepas de estreptomicetos marinos de la Bahía

Maxwell utilizando el sistema de identificación API Coryne. / Biochemical Profile of marine *Streptomyces* strains from Maxwell Bay using API Coryne system.

Test/Cepa	NIT	PYZ	PyrA	PAL	β GUR	β GAL	α GLU	β NAG	ESC	URE	GEL	GLU	RIB	XYL	MAN	MAL	LAC	SAC	GLYG	CAT
<i>Streptomyces</i> 1	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Streptomyces</i> 2	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Streptomyces</i> 3	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Streptomyces</i> 4	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Streptomyces</i> 5	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Streptomyces</i> 6	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Streptomyces</i> 7	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Streptomyces</i> 8	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Evaluación de Actividad Enzimática

Los estreptomicetos aislados de los sedimentos marinos de la Bahía Maxwell presentaron la capacidad de degradar los seis sustratos evaluados (Fig. 5). El porcentaje promedio de degradación varió para cada sustrato, siendo el almidón y la lecitina los que presentaron mayores valores (59.34% y 55.1%, respectivamente), seguido del Tween80 (38.10%) y el ADN (28.75%); asimismo, la caseína y la CMC fueron los que presentaron los menores valores de degradación (20.62% y 9.21%, respectivamente) (Fig. 6).

En la Tabla 7 se distingue el potencial multienzimático de cada cepa, en donde *Streptomyces* 7 logró formar los halos de mayor tamaño en el agar Tween80 y lecitina con valores de 60 mm y 53 mm, respectivamente; mientras que los halos de mayor tamaño de hidrólisis en los medios caseína y DNA, los obtuvo *Streptomyces* 6, con valores de 51 y 49 mm, respectivamente, y en el medio almidón, lo obtuvo *Streptomyces* 2 con un valor de 64 mm. Por otro lado, *Streptomyces* 1 y *Streptomyces* 8 fueron las cepas que presentaron menor tamaño en los halos de hidrólisis en todos los medios evaluados, siendo esta última, la única que no logró hidrolizar la caseína; sin embargo, ambas cepas fueron las únicas que lograron hidrolizar la CMC obteniendo, *Streptomyces* 1 halos de 35 mm y *Streptomyces* 8 halos de 44 mm.

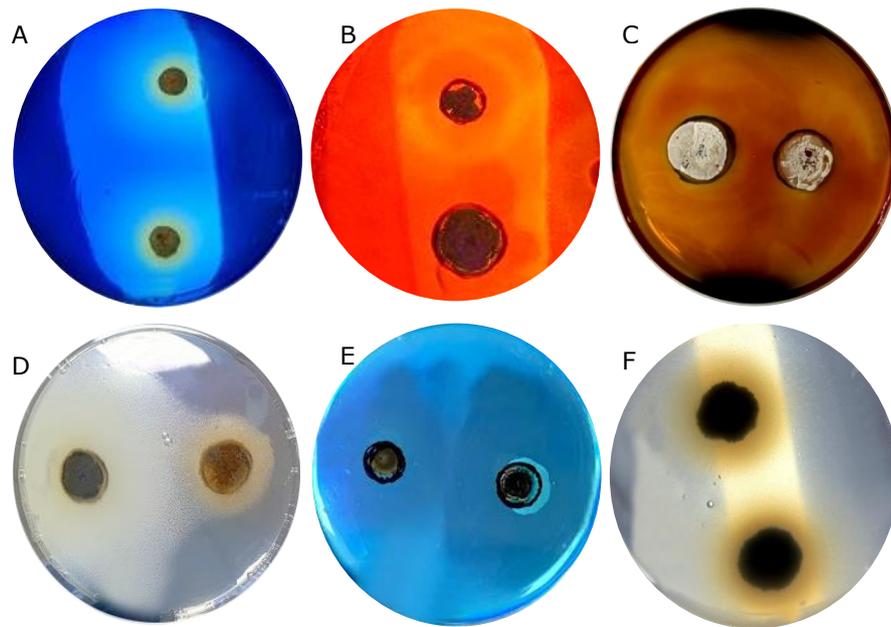


Figura 5. Pruebas de actividad enzimática de las cepas de estreptomicetos marinos aislados de la Bahía Maxwell, Antártica. A. Actividad DNAsa. B. Degradación de carboximetilcelulosa. C. Hidrólisis de almidón. D. Hidrólisis de Tween80. E. Hidrólisis de la caseína. F. Hidrólisis de la lecitina. / Figure 6. Enzymatic activity tests of marine *Streptomyces* isolated from Maxwell Bay, Antarctica. A. DNase activity. B. Carboxymethylcellulose degradation. C. Starch hydrolysis. D. Tween80 hydrolysis. E. Casein hydrolysis. F. Lecithin hydrolysis.

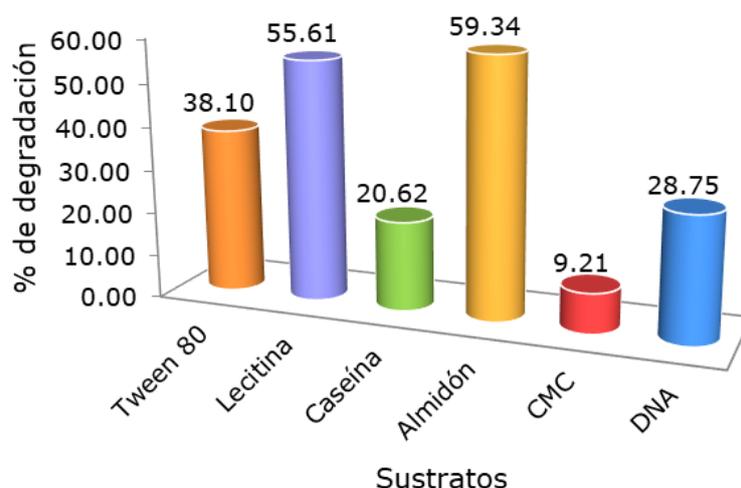


Figura 6. Porcentaje promedio de degradación sobre distintos sustratos del total de cepas de estreptomicetos marinos aislados de la Bahía Maxwell, Antártica / Percentage of degradation on different substrates of total marine *Streptomyces* strains from Maxwell Bay, Antarctica

Tabla 7. Producción de enzimas extracelulares de cepas de estreptomicetos marinos aisladas de la Bahía Maxwell, Antártica / Production of extracellular enzymes from marine *Streptomyces* strains isolated from Maxwell Bay, Antarctica.

Cepa	Halos de hidrólisis (mm)					
	Esterasas	Lecitinasas	Caseínasas	Amilasas	Celulasas	DNAas
<i>Streptomyces</i> 1	34	38	42	43	26	16
<i>Streptomyces</i> 2	55	47	50	64	0	32
<i>Streptomyces</i> 3	43	45	49	60	0	28
<i>Streptomyces</i> 4	35	38	46	61	0	39
<i>Streptomyces</i> 5	42	41	49	59	0	30
<i>Streptomyces</i> 6	50	44	51	61	0	45
<i>Streptomyces</i> 7	60	53	47	58	0	29
<i>Streptomyces</i> 8	20	13	0	6	32	13

Evaluación antibacteriana

Las cepas de estreptomicetos marinos aislados en este trabajo presentaron actividad antagonista, por lo menos, frente una cepa, principalmente, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Fig 7). La cepa *Streptomyces* 1 fue la única cepa capaz de inhibir las cuatro cepas testigo, asimismo, *Streptomyces* 1 y *Streptomyces* 8 fueron las únicas cepas que mostraron pigmentación difusible durante esta prueba (Fig. 9). Por otro lado, la cepa *Streptomyces* 5 mostró la mayor área de inhibición (30 mm) frente a *E. coli* ATCC 25922 y a *S. aureus* ATCC 25923.

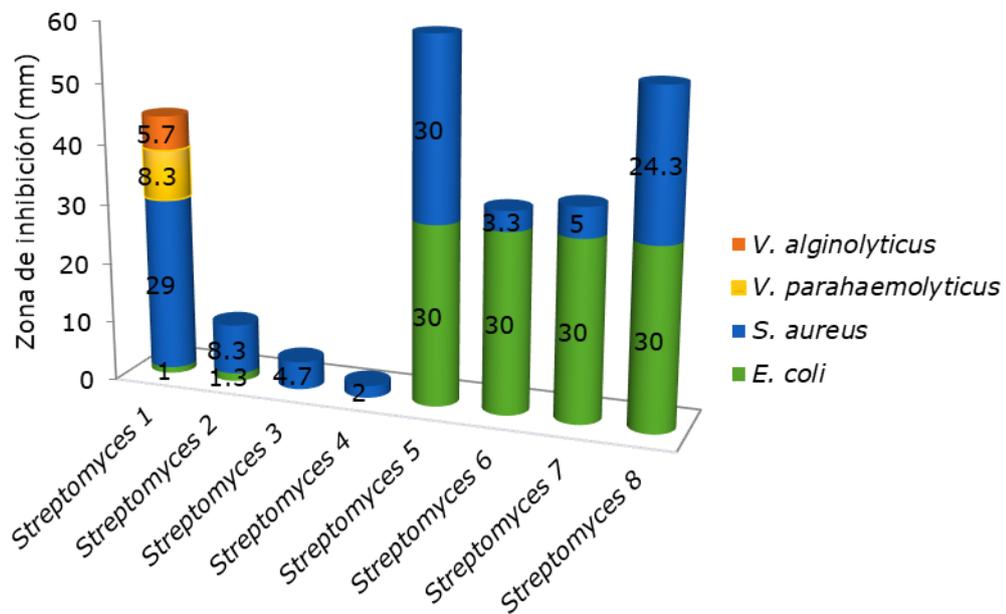


Figura 7. Capacidad inhibitoria de las cepas de estreptomicetos marinos de la Bahía Maxwell, Antártica. / Inhibitory capacity of marine *Streptomyces* strains from Maxwell Bay, Antarctic.

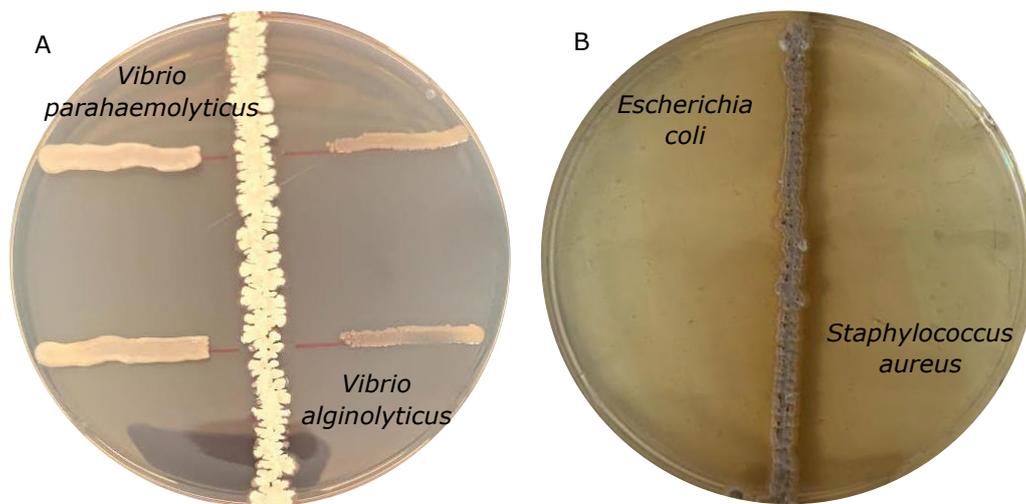


Figura 8. A) Producción de pigmentos difusible en la prueba de inhibición de la cepa *Streptomyces* 1 aislada de la Bahía Maxwell, Antártica frente a *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio alginolyticus* en agar marino. B) Producción de pigmentos difusible en la prueba de antagonismo de la cepa *Streptomyces* 8 frente a *E. coli* y *S. aureus* en agar marino. / Figure 8. A) Diffusible pigment production of *Streptomyces* 1 strain isolated from Maxwell Bay, Antarctic in inhibitory test against *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* on marine agar media. B) Diffusible pigment production of *Streptomyces* 8 strain in antagonism test against *E. coli* and *S. aureus* on marine agar.

Discusión

El continente antártico es un ambiente promisorio para el aislamiento de microorganismos con capacidad de producir metabolitos secundarios novedosos (Martorell et al. 2019, Nuñez-Montero et al. 2019). Dentro de este grupo de microorganismos, los actinomicetos no son la excepción, en el presente trabajo se aislaron 8 cepas de actinomicetos provenientes de sedimento marino pertenecientes al género *Streptomyces*. El número de cepas aisladas fue bajo en comparación a otros estudios

realizados en ecosistemas terrestres de la Antártica (Moncheva et al. 2002, Encheva-Malinova et al. 2014, Lavin et al. 2016). No obstante, los pocos trabajos en donde han evaluado muestras de sedimento marino provenientes de las Islas Shetland del Sur (Lamilla et al. 2017) y de la Base Gran Muralla (Xu, et al. 2014), también presentaron un bajo número de aislamientos, logrando aislar entre 10 y 5 cepas, respectivamente. Por lo mismo, no podemos descartar que el bajo número de actinomicetos aislados de Bahía Maxwell pudiera deberse a las técnicas estándar de aislamiento utilizadas en este trabajo; por lo que se debería trabajar en mejorar la técnica de pre-tratamiento con la finalidad de obtener actinomicetos pocos comunes (Vester et al. 2015, Subramani & Sipkema 2019). Otro factor importante que ha podido influir en el número de aislados es la temperatura de incubación empleada, dado que es una limitante para el crecimiento de organismos psicrófilos (Bakermans et al. 2008, Margesin & Miteva 2011). Asimismo, siendo la Antártica un ecosistema oligotrófico, los organismos que viven en estos ambientes podrían estar adaptados a crecer bajo esas condiciones (Poli et al. 2017); por lo que su cultivo en medios nutritivos no sería favorable además de la temperatura de incubación (Pulschen et al. 2017).

Por otro lado, en un trabajo donde utilizaron técnicas de secuenciamiento masivo de amplicones del 16S ARNr en muestras de sedimento marino de 8 estaciones cerca del volcán Orca en el estrecho de Bransfield, una zona próxima de la Bahía Maxwell, determinaron que el filo actinobacteria estaba pobremente representado en todas las estaciones analizadas con porcentajes entre 0.5 a 4% (Serrano et al. 2021). Sin embargo, esos resultados podrían deberse a la profundidad de donde las muestras fueron colectadas (>1000 mt), y a la localización del volcán en aguas abiertas del estrecho, a diferencia de la profundidad de la toma de muestras del presente estudio (<250 mt); por lo que no se podría afirmar categóricamente que en el continente antártico existe una baja presencia

de actinobacterias. Asimismo, se debe tener en cuenta que, en condiciones de laboratorio, menos del 2% del total de especies bacterianas de muestras ambientales logran aislarse utilizando medios convencionales, por lo que son consideradas como bacterias viables no cultivables (VBNC), grupo al que muchas de las especies del filo actinobacteria pertenecen (Dakhal et al. 2017).

Un medio estándar para el aislamiento de estos microorganismos y comúnmente utilizado es el medio almidón – caseína o almidón nitrato caseína (Peela et al. 2005, Ramesh & Mathivanan 2009, Augustine et al. 2013), debido a que el almidón combinado con el nitrato y la caseína constituye como una excelente fuente de carbono y nitrógeno para el desarrollo de *Streptomyces* (Küster & Williams 1964). No obstante, el presente estudio mostró que los medios actinomycete y GYM también denominando “*Streptomyces* Agar”, han servido para aislar una mayor cantidad de cepas en este trabajo. Esto concuerda con el trabajo de Lee et al. (2012), en el que determinó que el medio GYM es el más adecuado para aislar actinobacterias del suelo Antártico. Este medio contiene extracto de malta y carbonato de calcio, los cuales aportan los nutrientes que requiere el metabolismo del microorganismo y la fuente esencial de cationes para su crecimiento (López & Lemus, 2019).

Respecto a las características fenotípicas de las cepas aisladas en el presente estudio, el color del micelio aéreo en los medios ISP (2, 3, 4 y 5) era en tonalidades blancas a grisáceas a comparación al del micelio del sustrato el cual, en su mayoría, era en tonalidades amarillentas, verdosas y marrones. Estas mismas características también se observaron en algunas cepas descritas en el trabajo de Moncheva et al., (2002); en donde la pigmentación del micelio podría estar influida por el medio utilizado tanto para el aislamiento y purificación como demostraron los trabajos de Navas (2016) y Xu et al., (2014). Esto nos podría indicar que las cepas de actinomicetos pertenecientes al género

Streptomyces aislados de la Antártica, en su mayoría, poseen estas características fenotípicas comunes respecto a las cepas del mismo género aisladas en otras localidades.

La evaluación pigmentos es parte importante de la caracterización fenotípica de los microorganismos; no obstante, se menciona poco sobre la importancia de los pigmentos bacterianos en las industrias, cuando en realidad poseen diferentes aplicaciones tales como colorante en las industrias alimentarias, textiles, farmacéuticos, entre otros (Venil et al. 2013). En el caso de los actinomicetos, se ha reportado que el género *Arthrobacter* posee la capacidad de producir pigmentos de amplio rango, presentando distintas tonalidades desde amarillas, verdes, azules y rojas (Sutthiwong et al. 2014). Por otra parte, Órdenes-Aenishanslins et al. (2016) han estudiado la producción de pigmentos resistentes a la radiación UV producido por cepas bacterianas del filo Flavobacteria aisladas de la Isla Rey Jorge, Antártica, obteniendo pigmentos amarillos y rojos. En el presente trabajo se encontró que las cepas denominadas *Streptomyces* 1 y *Streptomyces* 8 presentaron un amplio rango de pigmentos difusibles tanto en los medios ISP como agar Actinomycete y agar marino, siendo este último utilizado también para la prueba de antibacteriana, en la que ambas cepas mostraron un buen performance. Parmar & Singh (2018) evaluaron los pigmentos extraídos de una cepa de *Streptomyces* como antimicrobianos frente a hongos, levaduras y cepas patógenas de humanos, así como el potencial uso de estos pigmentos en la industria cosmética, alimenticia, farmacéutica y textil. Por otro lado, Rahul et al. (2015) ha reportado una relación entre la producción de pigmentos y la capacidad antimicrobiana de *Serratia marscecens* y *Chromobacterium violaceum*. Esto podría darnos una idea del potencial antimicrobiano de las cepas *Streptomyces* 1 y *Streptomyces* 8 estudiadas en este trabajo, sin embargo, se necesitarían más estudios para corroborar esta posibilidad.

Los actinomicetos, por su naturaleza, son productores de metabolitos secundarios con potenciales aplicaciones en biotecnología (Lam 2006) dado que se han realizado estudios de estos microorganismos provenientes de distintos ambientes acuáticos (Gulve & Deshmukh 2011, Selvam, et al. 2011, Benhadj et al. 2019) siendo capaces de producir una variedad de enzimas hidrolíticas (Ramesh & Mathivanan 2009, Muhktar et al. 2018).

En el presente trabajo los actinomicetos aislados demostraron producir distintas enzimas extracelulares como amilasas, estererasas, lecitinasas, DNAsas y caseinasas, las cuales tienen una importante aplicación en las industrias textiles, alimentarias como aditivos, también en detergentes, biorremediación, entre otros (Suriya et al., 2016). La producción de enzimas por 10 cepas de actinobacterias aisladas de sedimento marino antártico también fueron observados en el trabajo de Lamilla et al., (2017), en el que se determinó que el 100% de sus cepas degradaron la caseína, 80% gelatina, 30% almidón, 70% tween 80 y ninguna logró degradar celulosa. Similares resultados también fueron reportados por Xu et al., (2014) en la que, de 5 cepas aisladas, solo 3 de ellas presentaron actividad proteolítica y amilolítica, mientras que solo 2, hidrolizaron el Tween 80. Asimismo, al igual que el trabajo de Lamilla et al., (2017), ninguna de sus cepas degradó la celulosa. En nuestro caso, 2 cepas de las 8 analizadas, fueron capaces de degradar la carboximetilcelulosa, lo que nos indicaría que esta capacidad podría estar reducida en las actinobacterias antárticas, dado que la presencia de algas, las cuales poseen a la celulosa en la composición de su pared celular, es limitada en este ecosistema, (Pellizzari et al. 2017; Bogolitsyn et al. 2020); por lo tanto, estos microorganismos estarían optando por degradar otros sustratos.

Dada la urgencia por encontrar novedosos metabolitos capaces de combatir la resistencia microbiana a los antibióticos, se exploran diversos ecosistemas terrestres y acuáticos (Baskaran et al. 2011, Hamed et al. 2018, Benhadj et al. 2019). Entre ellos, el continente

Antártico, ha demostrado ser un ambiente prometedor para la búsqueda de compuestos antimicrobianos producidos por actinobacterias según Núñez-Montero et al. (2019), en el cual, la cepa *Streptomyces fildesensis* So13.3, aislada de la península Fildes, Isla Rey Jorge, mostró un potencial inhibitorio de amplio espectro frente a patógenos Gram positivos y Gram negativos. Yoke-Kqueen et al. (2015) reportó que de 24 cepas de actinobacterias aisladas del suelo volcánico de Isla Decepción, 5 presentaron propiedades antimicrobianas frente a *Salmonella entérica* de dos serotipos diferentes. Encheva-Malinova et al., (2014) determinó que 15 de las cepas de *Streptomyces*, aisladas de la Isla Livingston (Antártica), todas fueron capaces de inhibir al menos una cepa fitopatógena Gram-positiva o Gram-negativa. En el presente estudio, las 8 cepas de estreptomicetos aisladas de la Bahía Maxwell mostraron actividad inhibitoria al menos frente a una de las cuatro cepas patógenas estándar con que se les enfrentó, siendo la cepa denominada *Streptomyces* 1 la única que mostró un amplio rango de inhibición frente a todas las cepas testigo. Factores tales como la temperatura, tiempo de incubación y composición de nutrientes del medio utilizado, podrían influir en la producción de metabolitos secundarios (Srinivasan et al. 1991). En este estudio, es muy probable que la actividad antibacteriana producidas por las cepas del género *Streptomyces* hayan sido influenciadas por estos factores; sin embargo, no fueron materia de evaluación, por lo tanto, se desconoce los resultados que se hubiera obtenido al alterar estas condiciones. El incremento del periodo de incubación (12 días), ocasionaría la disminución de los nutrientes en el medio generando la producción de metabolitos secundarios inducidos por estrés en el organismo (Doull & Vining 1990, Khattab et al. 2016), además que, a mayor tiempo de incubación, el organismo tiende a desarrollarse más hasta llegar a su fase estacionaria, fase en la cual comienza a producir estos metabolitos (Barka et al. 2016). C.M.J & E.J (2002), evaluaron que *Streptomyces viridifaciens* pasada su fase exponencial

(8 días) en adelante, tuvo una mejor producción de antibióticos. Asimismo, debe considerarse que la composición y concentración de nutrientes en el medio de cultivo, dado que la producción de metabolitos secundarios, en su mayoría, están regulados por la presencia o ausencia de alguna fuente de carbono (Ruiz et al. 2010) o de nitrógeno, fosfatos, entre otros (Van der Meij et al. 2017).

Por otro lado, la cepa *Streptomyces* 1 también fue la única capaz de inhibir a *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 y *Vibrio alginoliticus* ATCC 17749, potenciales patógenos de especies marinas cultivadas, esto podría indicar que es posible encontrar en ambientes marinos extremos organismos con potencial antagonista contra estos patógenos comunes en la acuicultura. Trabajos realizados por Tarazona-Janampa (2017), García-Bernal et al. (2015), León et al. (2010), León et al. (2016), Norouzi et al. (2018) ya habían reportado cepas de actinomicetos marinos con actividad inhibitoria frente a diferentes cepas patógenas de *Vibrio*; incluso algunos actinomicetos que también fueron aislados de tanques de cultivo han mostrado similar actividad (Chau et al. 2016, Babu et al. 2018).

El presente estudio podría indicar que la Bahía Maxwell es un ambiente propicio para el aislamiento de actinomicetos del género *Streptomyces* con capacidad de producir una variedad de enzimas y actividad antibacteriana contra cepas patógenas estándar, entre ellas el género *Vibrio*. Aunque este trabajo trata del aislamiento de cepas nuevas de actinomicetos de ambientes extremos y su potencial biotecnológico, se necesitarán estudios sobre la fisiología de estos organismos aislados en cultivos puros para caracterizar estos metabolitos. Este trabajo sienta las bases para la bioprospección en particular de las cepas denominadas *Streptomyces* 1 y *Streptomyces* 8 para futuros estudios de optimización para la producción de metabolitos secundarios, pigmentos y

enzimas mediante el control de los parámetros fisicoquímicos en los cultivos utilizando fermentadores microbiológicos.

Referencias Bibliográficas

Altschul, SF, Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3): 403-410.

Amat, A. M., Arques, A., López, F., & Miranda, M. A. 2005. Solar photo-catalysis to remove paper mill wastewater pollutants. *Solar Energy*, 79(4), 393–401.
<https://doi.org/10.1016/J.SOLENER.2005.02.021>

Arumugan, T., Senthil Kumar, P., Kameshwar, R. & Prapanchana, K. 2017. Screening of novel actinobacteria and characterization of the potential isolates from mangrove sediment of south coastal India. *Microbial Pathogenesis*, 107: 225 - 233

Augustine, D., Jacob, J. C., Ramya, K., & Philip, R. 2013. Actinobacteria from sediment samples of Arabian Sea and Bay of Bengal: biochemical and physiological characterization. *Int. J. Res. Mar. Sci*, 2, 56-63.

Babu DT, K Archana, B Kachiprath, S Solomon, G Jayanath, ISB Singh & R Philip. 2018. Marine actinomycetes as bioremediators in *Penaeus monodon* rearing system, *Fish and Shellfish Immunology*, doi: 10.1016/j.fsi.2018.01.037.

Bakermans C. 2008. Limits for microbial life at subzero temperatures. R. Margesin et al. (eds.) *Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology* (17 - 26).

Barka EA, P Vatsa, L Sanchez, N Gaveau-Vaillant, C Jacquard, HP Klenk, C Clément, Y Ouhdouch & GP van Wezel,. 2016. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 80 (1): 1 - 43

- Baskaran R, R Vijayakumar & PM Mohan. 2011.** Enrichment method for the isolation of bioactive actinomycetes from mangrove sediments of Andaman Islands, India. *Malaysian Journal of Microbiology*, 7(1), 22–28. <https://doi.org/10.21161/mjm.24410>
- Bogolitsyn K, A Parshina & L Aleshina. 2020.** Structural features of brown algae cellulose. *Cellulose* 27, 9787–9800. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03485-z>
- Bredholdt, H., Galatenko, O. A., Engelhardt, K., Fjærvik, E., Terekhova, L. P., & Zotchev, S. B. 2007.** Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: Isolation, diversity and biological activity. *Environmental Microbiology*, 9(11), 2756–2764. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01387.x>
- Benhadj M, D Gacemi-Kirane, T Menasria, K Guebla & Z Ahmane. 2019.** Screening of rare actinomycetes isolated from natural wetland ecosystem (Fetzara Lake, northeastern Algeria) for hydrolytic enzymes and antimicrobial activities. *Journal of King Saud University - Science*, 31: 706 - 712.
- Camacho A & E Fernandez. 2005.** Un mundo dominado por los microorganismos. *Ecología microbiana en la Antártida. Ecosistemas, revista científica y técnica de ecología y medio ambiente*, 14(2), 66–78.
- Chau NTT & NHT Anh. 2016.** Characterization of Actinomycetes antagonistic to *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shrimp pond sediment. *VNU Journal of Science: Earth and Environmental Sciences*, 32(1): 1 - 9.
- CMJ Innes & Allan EJ. 2002.** Induction, growth, and antibiotic production of *Streptomyces viridifaciens* L-form bacteria. *Journal of applied microbiology*, 90(3), 301-308.

Dhakal D, AR Pokhrel, B Shrestha & JK Sohng. 2017. Marine Rare Actinobacteria: Isolation, Characterization, and Strategies for Harnessing Bioactive Compounds. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1 – 9 pp.

Doull JL & LC Vining. 1990. Physiology of antibiotic production in actinomycetes and some underlying control mechanisms. *Biotech Adv*: 141 - 158

Encheva-Malinova M., M Stoyanova, H Avramova, Y Pavlova, B Gocheva, I Ivanova & P Moncheva. 2014. Antibacterial potential of streptomycete strains from Antarctic soils. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* ISSN:, 28(4), 721–727. <https://doi.org/10.1080/13102818.2014.947066>

Fernández M, I Hernández, & S Regueira. 2015. Bioactivos marinos en el tratamiento del cáncer. *Revista Electrónica Dr. Zoilo E. Marinello Vidaurreta*, 40(7).

García-Bernal M, AI Campa-Córdova, PE Saucedo, M Casanova-González, R Medina-Marrero & JM Mazón-Suástegui. 2015. Isolation and in vitro selection of actinomycetes strains as potential probiotics for aquaculture. *Veterinary World*, EISSN: 2231-0916.

Giordano D, RG Russo, di Prisco & C Verde. 2012. Molecular adaptations in Antarctic fish and marine microorganisms. *Marine Genomics*, 6: 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2011.09.003>

González A. 2014. Identificación Molecular Y Métodos De Conservación De Levaduras Y Hongos Filamentosos De Muestras Provenientes de la Antártida.

Gram, C. 1884. Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpreparaten. *Fortschritte der Medicin*, 2, 185-189.

Green, MR & J Sambrook. 2018. Hot start polymerase chain reaction (PCR). Cold Spring Harbor Protocols, 2018(5).

Gulve, RM & AM Deshmukh. 2011. Enzymatic Activity of Actinomycetes Isolated from Marine Sediments. Recent Research in Science and Technology; 3(5): 80 - 83

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, 41, 95-98.

Hamed N, D Abolghasem, M Mojtaba & RK Mohammad. 2018. Marine Actinomycetes with Probiotic Potential and Bioactivity against Multidrug-resistant Bacteria. International journal of molecular and cellular medicine, 7 (1): 44 – 52.

Hameş-Kocabaş EE & A Uzel. 2012. Isolation strategies of marine-derived actinomycetes from sponge and sediment samples. Journal of Microbiological Methods, 88: 342 - 347.

Jensen, P. R., Gontang, E., Mafnas, C., Mincer, T. J. & Fenical, W. 2005. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. Environmental Microbiology, 7 (7): 1039–1048

Kamjam, M., Sivalingam, P., Deng, Z., & Hong, K. 2017. Deep sea actinomycetes and their secondary metabolites. Frontiers in microbiology, 8, 760.

Khattab AI, EH Babiker & HA Saeed. 2016. Streptomyces: isolation, optimization of culture conditions and extraction of secondary metabolites. International Current Pharmaceutical Journal, 5(3): 27-32.

Küster, E. & Williams, S. 1964. Selection of media for the isolation of *Streptomyces*. Nature 202:928–929

Kumar, S & Baskaran R. 2012. In-vitro antimicrobial activity of marine actinobacteria against multidrug resistance *Staphylococcus aureus*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, S1802-S1807.

Kumar S, G Stecher, M Li, C Knyaz & K Tamura. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular biology and evolution, 35(6), 1547.

Lam KS. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. Current Opinion in Microbiology, 9 (3): 245–251.

Lamilla C, M Pavez, A Santos, A Hermosilla, V Llanquiao & L Barrientos. 2017. Bioprospecting for extracellular enzymes from culturable Actinobacteria from the South Shetland Islands, Antarctica. Polar Biology, 40(3), 719-726. doi:10.1007/s00300-016-1977-z

Lane D. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. En: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., (Eds.), Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. (pp.115-175). John Wiley & Sons Ltd., West Sussex.

Larkin MA, G Blackshields, NP Brown, R Chenna, PA McGettigan, H McWilliam, F Valentin. 2007. Clustal W and Clustal X Version 2.0. Bioinformatics 23 (21), 2947–2948

Lavin P, S Yong, C Wong & M De Stefano. 2016. Isolation and characterization of Antarctic psychrotroph *Streptomyces* sp. strain INACH3013. Antarctic Science 28(6), 433-442. doi:10.1017/S0954102016000250

Lee L-H, Y-K Cheah, S Mohd Sidik, NS Ab Mutalib, Y-L Tang, HP Lin & K Hong. 2012. Molecular characterization of Antarctic actinobacteria and screening for

antimicrobial metabolite production. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28(5), 2125–2137. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1018-1>

León J, L Liza, I Soto, D'L Cuadra, L Patiño & R Zerpa. 2007. Actinomycetes bioactivos de sedimento marino de la costa central del Perú. Revista Peruana de Biología, 14(2), 259-270. Recuperado de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332007000300013&lng=es&tlng=es.

León, J., Liza, L., Soto, I., Torres, M. & Orosco, A. 2010. Bacterias Marinas Productoras de Compuestos Antibacterianos Aisladas a partir de Invertebrados Intermareales. Rev Peru Med Exp Salud Publica; 27(2): 215-221

León, J., Aponte, J.J., Cuadra, L., Galindo, N., Jaramillo, L., Vallejo, M. & Marguet, E. 2016. Actinomicetos aislados de *Argopecten purpuratus* productores de enzimas extracelulares y con actividad inhibitoria de patógenos marinos. Revista de Biología Marina y Oceanografía; 51 (1): 69 - 80.

López R & JA Lemus. 2019. Multiplicación de *Streptomyces* sp. con propósitos de biocompostaje de subproductos de caña de azúcar.

Malek NA, AJK Chowdhury, Z Zainuddin & ZAZ Abidin. 2014. Selective isolation of actinomycetes from mangrove forest of Pahang, Malaysia. In Proceedings of the International Conference on Agriculture, Biology and Environmental Sciences (ICABES'14) (pp. 8-9).

Marginsin R & V Miteva. 2011. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. Research in Microbiology 162: 346 – 361.

Martorell MM, LAM Ruberto, LIC de Figueroa & WP Mac Cormack. 2019. Antarctic yeasts as a source of enzymes for biotechnological applications. In *Fungi of Antarctica* (pp. 285-304). Springer, Cham.

Moncheva P, S Tishkov, N Dimitrova, V Chipeva, S Antonova-Nikolova & N Bogatzevska. 2002. Characteristics of Soil Actinomycetes from Antarctica. *Journal Of Culture Collections*, 3, 3 – 14.

Mukhtar S, A Zaheer, D Aiysha, KA Malik. & S Mehnaz. 2017. Actinomycetes: a source of industrially important enzymes. *J Proteomics Bioinform* 10: 316-319. doi: 10.4172/0974-276X.1000456

Muyzer G & P Corstjens. 1993. Phylogenetic Analysis of the Metal-Oxidizing Bacteria *Leptothrix discophora* and *Sphaerotilus natans* using 16S rDNA Sequencing Data. *Systematic and Applied Microbiology*, 16 (2), 219-223.

Navas, D. 2016. Caracterización molecular de actinomicetes provenientes de ecosistemas antárticos. Recuperado de: [http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/22867/1/BQ 87.pdf](http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/22867/1/BQ%2087.pdf)

Nichols DS, K Sanderson, AD Buia, JL Van De Kamp, PE Holloway, JP Bowman, M Smith, CA Mancuso-Nichols, PD Nichols & TA Mcmeekin. 2002. Bioprospecting and biotechnology in Antarctica, *Conference Proceedings - The Antarctic: Past, Present and Future*, University of Tasmania, Hobart, Tasmania, pp. 85-105. ISBN 1 875796 24

Norouzi H, A Danesh, M Mohseni & MR Khorasgani. 2018. Marine actinomycetes with probiotic potential and bioactivity against multidrug-resistant bacteria. *International journal of molecular and cellular medicine*, 7(1), 44.

Nowrotek M, L Jałowiecki, M Harnisz & GA Plaza. 2019. Culturomics and metagenomics: In understanding of environmental resistome. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 13(3): 40 - 52.

Núñez-Montero K, C Lamilla, M Abanto, F Maruyama, MA Jorquera, A Santos, J Martínez-Urtaza & L Barrientos. 2019. Antarctic *Streptomyces fildesensis* So13. 3 strain as a promising source for antimicrobials discovery. *Scientific reports*, 9(1), 1-13.

Órdenes-Aenishanslin N, G Anziani-Ostuni, M Vargas-Reyes, J Alarcón, A Tello & JM Pérez-Donoso. 2016. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 162: 707 - 714.

Parada RB, ER Marguet & M Vallejo. 2017. Aislamiento y caracterización parcial de actinomicetos de suelos con actividad antimicrobiana contra bacterias multidrogo-resistentes. *Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XIX No. 2*, 15 – 23.

Parmar RS & C Singh. 2018. A comprehensive study of eco-friendly natural pigment and its applications. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 13: 22- 26.

Peela S, VB Kurada & R Terli. 2005. Studies on antagonistic marine actinomycetes from the Bay of Bengal. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21: 583–585

Pellizzari F, MC Silva, EM Silva, A Medeiros, MC Oliveira, NS Yokoya, D Pupo, LH Rosa & P Colepicolo. 2017. Diversity and spatial distribution of seaweeds in the South Shetland Islands, Antarctica: an updated database for environmental monitoring under climate change scenarios. *Polar Biology* 40 (8): 1671 – 1685.

Prakash D, N Nawani, M Prakash, M Bodas, A Mandal, M Khetmalas & B Kapadnis. 2013. Actinomycetes: A repertory of green catalysts with a potential revenue resource. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/264020>

Poli A, I Finore, I Romano, A Gioiello, L Lama & B Nicolaus. 2017. Microbial diversity in extreme marine habitats and their biomolecules. *Microorganisms*, 5 (25): 1 – 30.

Pulschen, A, A Bendia, A Fricker, V Pellizari, D Galante & F Rodríguez. 2017. Isolation of Uncultured Bacteria from Antarctica Using Long Incubation Periods and Low Nutritional Media. *Frontiers in Microbiology*, 8.

Quintana RJ, JL Agraz & LC Borgo. 1995. Biodiversidad en la Antártida. *Ciencia Hoy*, 6 (31).

Quiñones-Aguilar EE, Z Evangelista-Martínez & G Rincón-Enríquez. 2016. Los actinomicetos y su aplicación biotecnológica. *Elementos*, 101, 59-64.

Rahul S, P Chandrashekar, B Hemant, S Bipinchandra, E Mouray, P Grellier & P Satish. 2015. In vitro antiparasitic activity of microbial pigments and their combination with phytosynthesized metal nanoparticles. *Parasitology international*, 64(5), 353-356.

Ramesh S & Mathivanan N. 2009. Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(12), 2103-2111.

Ruiz B, A Chávez, A Forero, Y García-Huante, A Romero, M Sánchez, D Rocha, B Sánchez, R Rodríguez-Sanoja, S Sánchez & E Langley. 2010. Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Critical Reviews in Microbiology* 36:2, 146-167, DOI:10.3109/10408410903489576.

Saitou N & M Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.

Sanger F & AR Coulson. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94 (3): 441 – 446.
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90213-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90213-2)

Selvam K, B Vishnupriya & VSC Bose. 2011. Screening and quantification of marine actinomycetes producing industrial enzymes amylase, cellulase and lipase from south coast of India. *Int J Pharma Biol*, 2, 1481-1487.

Sengul F & O Gurel. 1993. Pollution profile of leather industries; Waste characterization and pretreatment of pollutants. *Water Science and Technology*, 28(2), 87–96.
<https://doi.org/10.2166/wst.1993.0083>

Serrano W, RM Olaechea, L Cerpa, J Herrera & A Indacochea. 2021. Bacterial diversity profiling around the Orca Seamount in the Bransfield strait, Antarctica, based on the 16S rRNA gene amplicon sequences. *Microbiol. Resour. Announc.* 7;10(1):01290-20

Shirling, EB & D Gottlieb. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J. System. Bacteriology*, 16, 313-340

Srinivasan MC, RS Laxman & MV Deshpande. 1991. Physiology and nutritional aspects of actinomycetes: an overview. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 7: 171 – 184.

Suárez B, M Hart, F Espinosa & D Salazar. 2012. Detección de mecanismos de resistencia en aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae* multidrogosresistentes. *Revista Cubana de Medicina*; 51(3): 228-238. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=35856>

Subramani R & D Sipkema. 2019. Marine rare actinomycetes: A promising source of structurally diverse and unique novel natural products. *Marine Drugs*, 17 (249): 1- 35.
doi:10.3390/md17050249

Sutthiwong N, M Fouillaud, A Valla, Y Caro & L Dufossé. 2014. Bacteria belonging to the extremely versatile genus *Arthrobacter* as novel source of natural pigments with extended hue range. *Food Research International*, 65: 156 - 162.

Suriya JS, M Bharathiraja, P Krishnan, Manivasagan SK & Kim. 2016. Extremozymes from Marine Actinobacteria. *Advances in Food and Nutrition Research*.

Tarazona-Janampa U. 2017. Caracterización de actinomicetos de sedimento marino y su potencial actividad antagonista frente a *Vibrio* sp. aislados de *Litopenaeus vannamei*. Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, 111 pp.

Van der Meij A, SF Worsley, MI Hutchings & GP van Wezel. 2017. Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS microbiology reviews*, 41(3), 392-416.

Venil CK, ZA Zakaria & WA Ahmad. 2013. Bacterial pigments and their applications. *Process biochemistry*, 48: 1065 - 1079.

Vester JK, MA Glaring & P Stougaard. 2015. Improved cultivation and metagenomics as new tools for bioprospecting in cold environments. *Extremophiles*, 19: 17 – 29.

Wink J. 2016. Compendium of Actinobacteria from Dr. Joachim M. Wink University of Braunschweig Copyright Dr. Joachim M. Wink, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung.

World Health Organization. 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization.

Weber T, P Charusanti, EM Musiol-Kroll, X Jiang, Y Tong, HU Kim & SY Lee.

2015. Metabolic engineering of antibiotic factories: New tools for antibiotic production in actinomycetes. Trends in Biotechnology, Vol. 33, pp. 15–26.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.10.009>

XU, Y. N., LU, Y. Y., XING, Y. Y., & XI, T. 2014. Isolation of Actinobacteria from Antarctic Marine Sediments for Enzyme Production and Antimicrobial Activity. Pharmaceutical Biotechnology, 21(5): 406-411.

Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, y Hy Chun, J. 2017. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. Int J Syst Evol Microbiol. 67:1613-1617

Yoke-Kqueen C, Lee L-H, Cheng-Yun, C. C., & Vui-Ling, C. M. 2015. Isolation, identification, and screening of actinobacteria in volcanic soil of Deception Island (the Antarctic) for antimicrobial metabolites. Polish Polar Research, 67-78.

YU Y, LI Huirong, ZENG Yinxin & CHEN Bo. 2005. Isolation and phylogenetic assignation of actinomycetes in the marine sediments from the Arctic Ocean. Acta Oceanologica Sinica, 6 (24): 135 – 142.

Zhang C & SK Kim. 2012. Application of Marine Microbial Enzymes in the Food and Pharmaceutical Industries. Advances in Food and Nutrition Research (Vol. 65, pp. 423–435). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416003-3.00028-7>

Anexos



RESOLUCIÓN DIRECTORAL ACADÉMICA DE CARRERA N° 049-A-DACBM-DAFCVB-U. CIENTÍFICA-2019

Lima, 18 de octubre de 2019

Visto el proyecto de tesis presentado por la Srta. **SUSAYA VICENTE KRSTEL**, alumna de la Carrera de Biología Marina, se expide la presente Resolución:

CONSIDERANDO:

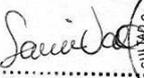
- o Que, para optar el título profesional en Biología Marina, de la Carrera de Biología Marina de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas de la Universidad Científica del Sur, es necesario la realización y sustentación de una tesis.
- o Que, el Reglamento de Tesis pertinente, dispone que el Proyecto de Tesis debe ser presentado a la Carrera de acuerdo al perfil aprobado, el cual debe ser dictaminado por el Comité de Investigación.
- o Que, la alumna **SUSAYA VICENTE KRSTEL**, ha cumplido con presentar su proyecto de tesis titulado "**ACTIVIDAD MULTIENZIMÁTICA Y EVALUACION ANTAGONISTA DE ACTINOMICETOS MARINOS DE LA BAHÍA MAXWELL (ANTÁRTICA)**" bajo la asesoría del Blgo. Wilbert Serrano Huiñocana.
- o Que la Comisión de Grados y Títulos de la Dirección ha emitido una evaluación favorable y recomienda la inscripción del proyecto citado.

Estando a lo dispuesto por el Reglamento General de Grados y Títulos de la Universidad Científica del Sur, el Reglamento de Tesis de la Carrera y a las normas vigentes, en uso de las atribuciones conferidas a la Carrera,

SE RESUELVE:

- 1° **APROBAR** el Proyecto de Tesis para optar el título profesional en Biología Marina titulado: "**ACTIVIDAD MULTIENZIMÁTICA Y EVALUACION ANTAGONISTA DE ACTINOMICETOS MARINOS DE LA BAHÍA MAXWELL (ANTÁRTICA)**"
- 2° Declarar a la Srta. **SUSAYA VICENTE KRSTEL**, expedita para la realización del Proyecto de Tesis aprobado.
- 3° Nombrar al Blgo. Wilbert Serrano Huiñocana como Asesor del Proyecto de Tesis, que realizará la alumna citado.
- 4° Disponer la inscripción del proyecto de tesis aprobado en el Registro de Tesis para optar el Título Profesional de la Carrera de Biología Marina de la CIENTÍFICA.

Regístrese, comuníquese y archívese.




 Dra. SONIA VALLE RUBIO
 Directora Académica de Biología Marina
 UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

T: (51) 610 6400
www.usc.edu.pe

Campus
Desarrollando Sur

**COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA
EN INVESTIGACIÓN CON ANIMALES
Y BIODIVERSIDAD**

CIENTÍFICA
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Constancia N° 138-CIEI-AB-CIENTÍFICA-2019

El presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación con Animales y Biodiversidad de la Universidad Científica del Sur (CIEI-AB-CIENTÍFICA) da constancia que el proyecto de investigación, cuyos datos se registran a continuación, ha sido **aprobado**.

Código de registro: **300-2019-PRE5**
 Título: **Actividad multienzimática y evaluación antagonista de actinomicetos marinos de la Bahía Maxwell (Antártica)**
 Investigador(a): **Krystal Susaya Vicente**

La aprobación del proyecto de investigación implica que el documento presentado a evaluación cumple con los lineamientos de Universidad en materia de investigación y ética, los cuales se sustentan en la normativa internacional vigente.

En tal sentido, esta aprobación carecerá de valor si es que el proyecto de investigación arriba indicado es modificado de cualquier forma. Toda enmienda, añadido, eliminación o eventualidad (eventos adversos, etc.) posterior a la fecha de aprobación debe ser reportado al CIEI-AB-CIENTÍFICA.

La vigencia de la aprobación de este documento es de dieciocho (18) meses (**hasta el 11 de mayo del 2021**), periodo en el que puede desarrollarse el proyecto. Cualquier trámite para su renovación deberá ser enviado antes del término de la vigencia de este documento, debiendo suspenderse todo desarrollo hasta que la renovación sea aprobada.

Villa El Salvador, 12 de noviembre de 2019




Méd. Vet. Gianmarco Paolo Rojas Morúa
 Presidente
 Comité Institucional de Ética en Investigación
 con Animales y Biodiversidad

T // (ET) 610 6400
 cación 2
www.cientifica.edu.pe

Campus
 Panamericana Sur
 km 19 - Lima 42