



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y
BIOLÓGICAS

CARRERA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA MARINA

“ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE ACTINOBACTERIAS AISLADAS
DEL TRACTO DIGESTIVO DE *MUGIL CEPHALUS* (LISA) FRENTE
A CEPAS BACTERIANAS DE ORIGEN CLÍNICO”

Tesis para optar el título profesional de:

BIÓLOGO MARINA

Presentado por:

Jenny Alexandra Gaviño Alva (0000-0002-5770-141X)

Asesor:

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

Lima – Perú

2020

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TRABAJO DE TESIS

Lima, 9 de diciembre 2020.

Los integrantes del Jurado de tesis:

Miembro: Biol. ELFER DANIEL VALDIVIA PAZ SOLDAN
Miembro: Biol. ROXANA NOEMI RODRIGUEZ VIAL
Presidente: M. Esp. JOSE WAGNER LOPEZ REVILLA

Se reúnen para evaluar el trabajo de bachiller titulado:

"Actividad antagonista de actinobacterias aisladas del tracto digestivo de *Mugil cephalus* (Lisa) frente a cepas bacterianas de origen clínico"

Presentada por el/la estudiante:

- Jenny Alexandra Gaviño Alva

Para optar por el título profesional de Bióloga Marina

Asesor: Dr. Wilbert Serrano Winocaña

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

Estudiante: Jenny Alexandra Gaviño Alva	Nota :18 (dieciocho)		
Aprobado ()	Aprobado - Muy buena (X)	Aprobado - Sobresaliente ()	Desaprobado ()

Los miembros del jurado firman en señal de conformidad.



Biol. ELFER DANIEL VALDIVIA PAZ SOLDÁN
Miembro 1



M. Esp. JOSÉ WAGNER LÓPEZ REVILLA
Presidente



Biol. ROXANA NOEMÍ RODRÍGUEZ VIAL
Miembro 2



Dr. WILBERT SERRANO WINOCAÑA
Asesor

Agradecimientos:

Primero quisiera agradecer a mis padres por todo su apoyo incondicional a lo largo de todo este camino, a mis abuelos que a pesar que ya no se encuentren conmigo, siempre soñaron con verme triunfar y a toda mi familia por su compañía y soporte.

A todos los integrantes del laboratorio de Laboratorio de Microbiología Molecular y Genómica Bacteriana de la Universidad Científica del Sur, incluyendo a mi asesor, por guiarme y ayudarme en la realización de esta tesis.

Finalmente, agradezco a todos los que me acompañaron en este proceso.

Actividad antagonista de actinobacterias aisladas del tracto digestivo de *Mugil cephalus* (Lisa) frente a cepas bacterianas de origen clínico

Antagonistic activity of actinobacteria strains isolated from the gut of *Mugil cephalus* (Striped mullet) against bacterial clinical strains

Jenny A. Gaviño^{1a}, Wilbert Serrano^{1b}

¹ Laboratorio de Microbiología Molecular y Genómica Bacteriana de la Universidad Científica del Sur.

a Bachiller en Biología Marina

 <https://orcid.org/0000-0002-5770-141X>

b PhD en Microbiología Marina y Ecología Molecular

 <https://orcid.org/0000-0001-7133-2895>

Contribuciones de los autores: Gaviño JA participó en el diseño y desarrollo de la investigación, Wilbert S participó como guía en la investigación. Todos los autores participaron en la preparación y discusión del manuscrito.

Financiamiento: Fondos internos de la Universidad Científica del Sur.

Conflictos de interés: Los autores participantes manifiestan no poseer conflictos de interés en la publicación de este artículo científico.

Correspondencia: Jenny Alexandra Gaviño Alva

Dirección: Universidad Científica del Sur, Laboratorio de Microbiología Molecular y Genómica Bacteriana, Carretera Panamericana Sur 19, Villa El Salvador 15067, Lima, Perú.

Correo electrónico: alegav04@hotmail.com

Actividad antagonista de actinobacterias aisladas del tracto digestivo de *Mugil cephalus* (Lisa) frente a cepas bacterianas de origen clínico

RESUMEN

Objetivos. Evaluar la capacidad inhibitoria de los metabolitos secundarios extraídos de cepas de actinobacterias aisladas del tracto digestivo de *Mugil cephalus* (Lisa) frente a cepas clínicas resistentes a antibióticos. **Materiales y métodos.** Un total de 22 cepas de actinobacterias marinas fueron previamente aisladas del tracto digestivo de *Mugil cephalus* y se evaluó la capacidad antagonista de los extractos crudos frente a 11 cepas clínicas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* que presentan perfiles de resistencia a los antibióticos. En base a su gran capacidad antagonista en pruebas *in vitro* frente a la mayoría de cepas patógenas, la cepa RFE02 fue seleccionada para extraer metabolitos secundarios utilizando solventes orgánicos como acetato de etilo, el mismo extracto también fue utilizado para calcular la concentración mínima inhibitoria (CMI). Adicionalmente, cultivos de la cepa RFE02 se sometieron a pruebas de estimulación con la finalidad de incrementar la producción de compuestos bioactivos. **Resultados.** Del total de cepas evaluadas 13 mostraron actividad antagonista frente a la mayoría de las cepas clínicas, siendo la cepa RFE02 la que demostró un mayor potencial inhibitorio frente a todas las cepas clínicas con las que se enfrentó. Los extractos orgánicos preparados a partir de la cepa RFE02 cultivada en medio conteniendo glucosa a una concentración de 25% mostraron un incremento en la formación de los halos de inhibición de 12 a 18 mm con una misma tendencia para la CMI de 7.01 y 14.02µg/ml. **Conclusiones.** La microbiota de los peces marinos podría representar un nicho inexplorado como una fuente alternativa de microorganismos con capacidad de producir compuestos bioactivos capaces de inhibir cepas clínicas resistentes a los antibióticos de uso común.

Palabras clave: Antagonismo; *Mugil cephalus*; Resistencia bacteriana; *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*.

ABSTRACT

Objectives: Evaluate the inhibitory capacity of secondary metabolites extracted from actinobacteria strains isolated from the digestive tract of *Mugil cephalus* (striped mullet) against antibiotic resistant clinical strains. **Materials and methods:** A group of 22 marine actinobacteria strains previously isolated in pure culture from the digestive tract of *Mugil cephalus* were selected, and the antagonistic capacity of the corresponding extracted secondary metabolites were tested against 11 clinical strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* with different antibiotic resistance profiles. Among them, the strain RFE02 showed a good performance inhibiting almost all pathogenic strains, therefore this strain was selected for chemical extraction of secondary metabolites with ethyl acetate. Ethyl acetate extractions were also used to appraise the minimum inhibitory concentration (MIC). Furthermore, stimulation tests on the RFE02 strain were conducted in order to improve the production of bioactive compounds. **Results:** This study evaluated 22 strains, among them 13 showed antagonistic activity against at least one and all of the tested clinical strains. The strain RFE02 showed the highest inhibitory potential against all tested clinical strains. The organic extracts obtained from strain RFE02 growing on 25% glucose concentration showed an increment on the size of inhibition zone from 12 to 18 mm in agar plates, the same trend was observed for the MIC values which ranged from 7.01 and 14.02 μ g/ml. **Conclusions:** The microbiota of marine fish could represent a particular microcosms source of unusual microorganisms with the potential to produce novel bioactive compounds capable of inhibit common antibiotic resistant clinical strains.

Key words: Antagonism activity; *Mugil cephalus*; bacterial resistance; *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*.

INTRODUCCIÓN

En los inicios del siglo XX gracias al descubrimiento de la penicilina se comenzó el uso intensivo de los antibióticos a nivel mundial, siendo en particular en la década de 1940, donde se inicia la producción en cantidades industriales de estos agentes bactericidas y bacteriostáticos para su uso cotidiano en las prácticas médicas(1). Aunque el objetivo principal de reducir la mortandad causadas por infecciones producidas por agentes patógenos fue alcanzado, con los años, los primeros casos de resistencia de cepas

patógenas como *Escherichia coli*, *Shigella sp.* y *Salmonella sp.* frente a antibióticos comúnmente utilizados como la ampicilina y ciprofloxacina se presentaron, siendo atribuida esta al uso indiscriminado de los antibióticos(2,3). En la actualidad el problema es mayor debido a que la gran mayoría de bacterias de origen clínico son resistentes a casi todo tipo de agentes antibacterianos, incluyendo antibióticos de última generación, detergentes, solventes orgánicos, entre otros(4).

Frente a esta problemática diversos grupos de investigación en el mundo están dedicados a la búsqueda de nuevas biomoléculas antimicrobianas, las cuales generalmente son obtenidas de diversas fuentes. Una de ellas, todavía válida en la actualidad es la exploración de diversos ecosistemas como origen de novedosos agentes antimicrobianos los cuales son producidos por microorganismos procariotas u otros organismos superiores como las plantas, los cuales entre otras capacidades deseables deberán poseer el potencial para producir metabolitos secundarios con una amplia actividad antagonista frente a patógenos clínicos resistentes (5). Dentro de los procariotas, un grupo que excepcionalmente se destaca debido a su potencialidad para producir diversos compuestos bioactivos son las bacterias pertenecientes al filo Actinobacteria. Este filo está compuesto por bacterias Gram-positivas que en general constituyen el 20 y 60% del suelo en ambientes terrestres y pueden también ser encontradas en ambientes acuáticos, incluyendo los ambientes marinos (6,7). Los metabolitos secundarios derivados de estos microorganismos, han sido utilizados en medicina, como agentes antibacterianos, anti fúngicos, anti-cancerígenos, insecticidas, anti-parasitarios, anti-virales así como también en la industria como productores de enzimas (8,9). Esto se ve reflejado en el número de antibióticos que tienen como origen a este grupo de microorganismos en específico. Se ha reportado que más del 90% de metabolitos con alguna actividad farmacológica se originan de este grupo de bacterias, por lo que al menos dos tercios de las 10,000 sustancias activas existentes en la actualidad derivan de las actinobacterias (10).

El ecosistema marino representa un único y extenso entorno en el que muchos organismos interactúan de distintas maneras, por lo que el desarrollo de defensas químicas es una estrategia de supervivencia en un ambiente tan competitivo. Los metabolitos secundarios como un subproducto de las rutas metabólicas de diversos

organismos, incluyendo las actinobacterias, son producidos en respuesta a los agentes condicionantes externos tanto bióticos como abióticos (11–13). Estos metabolitos poseen una gran variedad de actividades biológicas y cada cepa de actinobacteria tiene el potencial genético de producir entre 10 a 20 metabolitos secundarios (8,14). Sin embargo, considerando que la mayoría de los antibióticos son originados de actinobacterias terrestres estas ya han sido abundantemente exploradas y su eficacia en la actualidad está disminuida, por ello en la actualidad la atención se dirige a otros ambientes pobremente explorados o extremos de donde se espera encontrar novedosos metabolitos secundarios con estructuras químicas novedosas(15).

La búsqueda y aislamiento de nuevas cepas actinobacterias marinas se ha enfocado a los sedimentos (16), invertebrados móviles y sésiles así como en esponjas marinas (15,17,18), moluscos, gasterópodos y equinodermos(19) e incluso de la superficie de las algas (20). Sin embargo, el tracto digestivo de los vertebrados como los peces no han sido todavía objeto común de investigación para la búsqueda de fuentes alternativas de productos naturales por lo que existe una pequeña cantidad de estudios relacionados con este microcosmos (7,21,22). El objetivo de este estudio ha sido evaluar la capacidad inhibitoria de los metabolitos secundarios extraídos de cepas de actinobacterias aisladas del tracto digestivo de *Mugil cephalus* (Lisa) frente cepas clínicas resistentes a los antibióticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

CEPAS DE ACTINOBACTERIAS

Los microorganismos utilizados en este estudio fueron cepas de actinobacterias pertenecientes a diferentes géneros ($n=22$) que han sido previamente aislados del tracto digestivo de ejemplares del pez marino *Mugil cephalus* (Tabla 1). Las cepas de actinobacterias fueron proporcionadas por el banco de cepas del laboratorio de Microbiología Marina y Genómica Bacteriana MMGB de la Universidad Científica del Sur (UCSUR). Estas cepas fueron identificadas previamente hasta el nivel de especie mediante la amplificación y secuenciación del gen menor ribosomal 16S rARN, las mismas que se encuentran almacenadas en condición de ultracongelación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en medio conteniendo agentes crioprotectores como glicerol al 20%.

La reactivación de las cepas de actinobacterias para este estudio fue realizada mediante cultivos en matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 100 ml de caldo marino Zobell 2216 (HiMedia Laboratories), bajo agitación constante a 200 rpm utilizando un agitador orbital (Orbit 1000 - Labnet). En estas condiciones las cepas se incubaron a una temperatura de 30 °C por un periodo de 7 a 10 días dependiendo del ritmo de crecimiento de las actinobacterias, la cual se determinó observando la turbidez del medio y la formación de gránulos (pellet celular) (23).

CULTIVO Y FERMENTACION DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Las cepas de actinobacterias seleccionadas y reactivadas fueron inoculadas en el medio en el que fueron originalmente aisladas, con este propósito se usaron dos medios recomendados por el International *Streptomyces* Project (ISP): Agar Gym (ISP 2) [Glucosa: 0.8 g; Extracto de levadura: 0.8 g; MEAB: 3.34; CaCo₃: 0.4 g; Agar: 3 g, Agua destilada: 200 ml] y Agar Avena (ISP 3) [Avena: 20 g; Agar: 15 g; Agua de mar: 1000 ml]. En dichos medios, se inocularon 100 µl de los cultivos activados y fueron incubados a 30 °C por una semana hasta evidenciar la presencia de micelio aéreo. La pureza del cultivo se verificó por microscopia utilizando tinción Gram.

MANEJO Y COLECCIÓN DE CEPAS CLÍNICAS

Para estudiar el potencial antagonista de las actinobacterias se utilizaron diversas cepas clínicas de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* las mismas presentaron diferentes patrones de resistencia ($n=11$) (Tabla 2), además se utilizaron 2 cepas de la colección de la American Type Culture Collection (ATCC) *K. pneumoniae* ATCC 13883 y *E. coli* ATCC 25922 como control para las pruebas de antagonismo. Las cepas de origen clínico provienen del Hospital Nacional Dos de Mayo, las cuales fueron sembradas en agar MacConkey y preservadas a -80 °C con glicerol al 20% hasta su posterior uso en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Genómica Bacteriana de la UCSUR.

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS ORGÁNICOS

Cultivos activos obtenidos en medio ISP2 e ISP3 fueron utilizados como pre-inóculos y colocados en frascos Erlenmeyer conteniendo 100ml de caldo Zobell para el proceso de fermentación. Con la ayuda de un agitador orbital, estos cultivos se mantuvieron en agitación a 200 rpm constante y a una temperatura constante de 30 °C por espacio de

7-10 días. Una vez que se evidenció crecimiento de las cepas, 10ml de cada uno de los caldos Zobell fueron inoculados en frascos Erlenmeyer conteniendo 100ml del medio para inducción de producción de metabolitos 5294 (24) [Almidón: 10 g; Levadura: 2 g; Glucosa: 10 g; Corn Steep Liquor: 2,5 g; Peptona: 2 g; NaCl: 1 g; CaCO₃: 3 g; Agua de mar: 1000 ml] los mismos que se mantuvieron bajo las mismas condiciones de cultivo mencionadas anteriormente por 7 a 15 días hasta evidenciar cambio de coloración en los cultivos.

Posteriormente, cada cultivo fue transferido a tubos de colección de 50ml para ser centrifugados por 15 minutos a 9,000rpm. El sobrenadante de cada cultivo fue filtrado con papel Whatman 40(25) y estos extractos libres de células fueron conservados a 4 °C para ser utilizados posteriormente para la prueba antagonismo primario por el método de difusión en agar.

PRUEBAS DE ANTAGONISMO PRIMARIAS Y SECUNDARIAS

Las pruebas de antagonismo primarias fueron realizadas mediante el método de difusión en agar (Pocillo) y por triplicado (26,27). Placas con medio Müller-Hinton (HiMedia Laboratories) fueron previamente inoculadas con cultivos de 24 h de las cepas clínicas, ajustadas a 0.5 de la escala MacFarland con un turbidímetro de suspensión DEN-1B (Grant Instruments). Con la ayuda de un hisopo estéril se esparció el inóculo (patógenos clínicos) por toda la placa de manera uniforme, una vez secas, se excavaron pocillos sobre el agar utilizando pipetas Pasteur a manera de sacabocados, para posteriormente colocar 15 µl de los diferentes extractos crudos originados de actinobacterias en cada pocillo. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 h y las zonas de inhibición se midieron tomando en consideración el diámetro en milímetros (mm) de los halos formados. Se determinó como actividad inhibitoria positiva, aquellas cepas que exhibieron halos mayores a 1 mm(28), mientras que las que no presentaron halos en lo absoluto, se consideró como una actividad negativa.

Para las pruebas de antagonismo secundarias se seleccionó la cepa que mostró una mejor actividad antagonista primaria y previamente a la preparación del extracto se corroboró mediante la prueba de difusión en agar que la cepa seguía teniendo actividad antagonista. Se utilizó el sobrenadante completamente libre de células provenientes del

cultivo mediante las técnicas de centrifugado y filtrado anteriormente mencionadas y este fue sometido a una extracción con el solvente orgánico acetato de etilo en un volumen de 1:1(26,29). El frasco con el sobrenadante más el solvente se mantuvo en movimiento constante por 24h para que ocurra una buena mezcla. La fase orgánica fue removida mediante el uso de un rotavapor RV 10 (IKA) como medio para concentrar los metabolitos a 33 rpm, 39 °C de temperatura y 200 mbar de presión por 15 minutos. El extracto concentrado fue re-suspendido en dimetilsulfóxido (DMSO) al 1% y almacenado a 4 °C por 2 días hasta su posterior uso en pruebas de inhibición en placas (difusión en agar) y para calcular la concentración mínima inhibitoria (CMI).

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA EN LA PRODUCCION DE METABOLITOS SECUNDARIOS

El medio 5294 fue ajustado a diferentes concentraciones de glucosa con la finalidad de promover la mejor producción metabolitos secundarios bajo condiciones de estrés de la cepa (30). Para ello, se prepararon 4 frascos Erlenmeyer conteniendo el medio 5294 adicionando diferentes concentraciones de glucosa a cada uno [100%: 10 g glucosa; 50%: 5 g glucosa; 25%: 2.5 g glucosa; 0%: 0 g glucosa] los mismos que fueron incubados a 30 °C en un agitador orbital a 200rpm por una semana hasta evidenciar la producción del pigmento respectivo a cepa de actinobacteria, similar al medio solido en el que fue cultivado inicialmente. Se realizaron pruebas de antagonismo primarias, secundarias y de CMI con sus respectivas repeticiones ($n = 3$) para verificar el efecto de esta variación en el medio de fermentación y su influencia en el incremento de la producción de metabolitos secundarios.

CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA (CMI)

Para esta prueba se utilizaron las cepas clínicas inoculadas previamente en placas con agar MacConkey (HiMedia Laboratories) preparadas un día antes a la prueba. Las cepas clínicas utilizadas fueron ajustadas a 0.5 según la escala de McFarland y luego fueron diluidos a una concentración de 1:1000 en caldo Müller-Hinton. Para este ensayo se utilizaron placas de 96 pocillos (SPL). En cada pocillo se distribuyeron 50 μ l de caldo Müller-Hinton, empezando por las columnas de la primera fila, se agregaron 30 μ l del extracto orgánico diluido en DMSO a todos los pocillos y luego 40 μ l de la primera fila

fueron transferidos a la segunda fila y así sucesivamente hasta la última fila, finalmente 50 µl de los caldos bacteriano conteniendo las cepas clínicas previamente diluidas fueron distribuidos en todos los pocillos de la placa, siendo las concentraciones finales de 56, 28.04, 14.02, 7.01, 3.50 y 1.75 µg/ml respectivamente. Como control positivo se dejaron pocillos conteniendo solo el caldo + cultivo bacteriano y como control negativo se usaron pocillos solo conteniendo caldo. Adicionalmente se usaron pocillos conteniendo cultivo bacteriano + DMSO para verificar que este solvente orgánico no haya tenido un efecto negativo en el crecimiento de las cepas patógenas(31).

RESULTADOS

Un total de 22 cepas de actinobacterias previamente aisladas del tracto digestivo de *Mugil cephalus* fueron evaluadas y seleccionadas de acuerdo a su actividad inhibitoria según el método de difusión en agar (pocillos) en una prueba de antagonismo primaria. De las mismas, 13 cepas mostraron actividad frente a una o varias de las diferentes cepas de los patógenos clínicos pertenecientes a las especies *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* (Tabla 3, Figura 1). Como se puede observar en la Tabla 3, la cepa RFE02 resultó ser la más efectiva al presentar actividad inhibitoria frente a todas las cepas clínicas con que se enfrentó, produciendo halos de inhibición desde 2.7 a 8 mm frente a las cepas de *K. pneumoniae*, siendo estos valores incluso mayores al control de dicha cepa. Para el caso de las cepas clínicas de *E. coli*, la cepa RFE02 produjo halos de inhibición entre 2 hasta 9.3 mm, las mismas que igualmente fueron valores mayores a su respectivo control. De la misma manera las cepas RFE04, RFE06, RFF04, RFF10 y RFF12 mostraron también actividad antagonista contra a varias cepas de origen clínico, pero presentando halos de inhibición con valores menores en comparación a la cepa RFE02 en un rango de 1 a 8 mm. La actividad inhibitoria de estas cepas fue mayor frente a las cepas de *K. pneumoniae* respecto a las cepas clínicas de *E. coli*. Por otro lado, las cepas RFE05, RFF13, RFF15, RFG24, RFG04, RFA05 y RFG06 exhibieron una mayor actividad inhibitoria selectiva solo frente a las cepas de *K. pneumoniae* mostrando halos de inhibición con valores en un rango de 2 a 8.7 mm.

En base a los resultados obtenidos en las pruebas primarias, la cepa RFE02 fue seleccionada para las siguientes pruebas secundarias en donde los metabolitos secundarios se extraen y concentran utilizando el solvente orgánico acetato de etilo. Los

productos de esta extracción fueron utilizados para reevaluar su actividad inhibitoria de la misma manera que se realizó para las extracciones primarias, así como también para la prueba de inducción de producción metabolitos. Como se puede apreciar en la Tabla 4, los metabolitos producidos por la cepa RFE02 que fueron cultivadas en condiciones de reducción de glucosa al 25% (2.5g), mostró mejores resultados en la prueba de difusión en agar inhibiendo a todas las cepas clínicas con las que se enfrentó formando halos de inhibición entre 12 a 18 mm (Figura 2).

Por otro lado, las prueba de CMI con el extracto de acetato de etilo de la cepa RFE02, mostraron aún mejores resultados (Tabla 5). Como se puede observar, en este caso los valores del CMI fueron de 7.01 y 14.02 $\mu\text{g/ml}$ frente a todas las cepas clínicas testadas, estos resultados fueron evaluados utilizando microplacas de 96 pocillos y haciendo las lecturas de la densidad de células mediante el uso del lector de placas Synergy LX (Biotek) a una absorbancia de 650 nm. De la misma manera, pruebas adicionales también mostraron que el DMSO no tuvo ningún efecto inhibitorio en el desarrollo de este experimento.

DISCUSION

Existen pocos estudios en organismos superiores marinos y su microbiota asociada como fuente alternativa y novedosa de metabolitos secundarios. La mayoría de los esfuerzos de investigación provienen de estudios realizados en microorganismos asociados a invertebrados o aislados directamente de sedimentos marinos, los mismos que han mostrado que muchos de estos microorganismos son capaces de producir una gran cantidad de compuestos novedosos con diferentes actividades biológicas, entre ellas tener la capacidad de inhibir patógenos. Como ejemplo, ciertas actinobacterias aisladas de esponjas marinas, han demostrado tener actividad antagonista frente a bacterias Gram-negativas como *E. coli* y *K. pneumoniae* (32) así como para otros patógenos humanos (15), mientras que muchas de actinobacterias aisladas de sedimentos marinos han mostrado también actividad frente a patógenos multi-drogo resistentes (MDR) (6,33).

En el presente estudio se muestra una evidencia más de que las actinobacterias asociadas en este caso al tracto digestivo de vertebrados marinos poseen también el

potencial de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas de origen clínico resistentes a los antibióticos. En otra investigación, Sanchez et al.(21) basándose en el Proyecto del Microbioma Humano, demostró el gran potencial de la microbiota asociada a los intestinos de los peces marinos como una fuente de nuevos compuestos bioactivos. En el mismo estudio se mostró que una gran variedad de actinobacterias asociadas a intestinos de diferentes especies de peces marinos mostraron actividad antagonista frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Los resultados obtenidos en el presente trabajo resultan interesantes, ya que 13 de las 22 cepas aisladas del tracto digestivo de *M. cephalus* presentaron actividad antagonista frente a la mayoría de las cepas clínicas evaluadas, en particular las cepas RFE02, RFE04, RFE06, RFF04, RFF10 y RFF12 las mismas que pertenecen al género *Streptomyces*. De este modo este trabajo podría ser comparable al estudio realizado por Vignesh et al. (7) en donde 14 cepas de actinobacterias también fueron aisladas de los intestinos de dos especies de peces marinos (*Rastrelliger kanagurta* y *Panna microdon*), siendo también la mayoría de estas cepas pertenecientes al género *Streptomyces* mostrando en este caso dos de las cepas aisladas tanto actividad antibacteriana como anti fúngica. En el presente estudio también se evidenció que las cepas RFE05, RFF13, RFF15, RFG24, RFG04, RFA05 y RFG06 mostraron una actividad inhibitoria selectiva en su mayoría para las cepas de *K. pneumoniae*, pero no para las cepas de *E. coli*. Esto podría deberse a los diferentes perfiles de resistencia que poseen cada una de las cepas utilizadas (Tabla 2). La mayoría de cepas de *E. coli* presentan resistencia a casi todos los antibióticos utilizados comúnmente en tratamientos clínicos, mientras que las cepas de *K. pneumoniae* utilizadas en este estudio presentaron un amplio perfil de variación entre resistentes y muy sensibles. En un estudio previo ambas cepas han mostrado un perfil de susceptibilidad variado presentando además diversos tipos de mecanismos de resistencia (34) por lo que pueden responder de manera diferente a las mismas pruebas de inhibición a pesar de ser ambas especies Gram-negativas.

El uso de solventes orgánicos es frecuentemente utilizado para concentrar principios bioactivos partir de cultivos microbianos (33) y su uso va a depender la naturaleza química de los metabolitos secundarios que se analizan así como de su polaridad. Entre estos solventes el acetato de etilo es el más utilizado y recomendado de acuerdo a la

literatura (33,35), esto debido a que los extractos con acetato de etilo han demostrado tener una mayor efectividad antagonista frente a diversas bacterias y hongos patógenos MDR (23) en comparación a otros solventes orgánicos. Los resultados de las pruebas de antagonismo de los metabolitos secundarios de la cepa RFE02 extraídos con acetato de etilo, mostraron halos de inhibición de mayor diámetro en comparación a las pruebas en donde solo se utilizaron extractos crudos (sobrenadante). De la misma manera Cita et al. (32) también han reportado que obtuvieron una mayor inhibición con los extractos de metabolitos secundarios de bacterias aisladas de esponjas utilizando acetato de etilo. Por otro lado, Srivibool R y Sukchotiratana M. sugieren que las zonas de inhibición que presentan una mayor área demuestran una mayor eficacia como antagonista frente a patógenos susceptibles en comparación con aquellos que muestran halos pequeños o ninguno lo cual indicaría algún mecanismo de resistencia frente al metabolito (36). En el presente estudio los extractos con solventes orgánicos mostraron buenos resultados en cuanto a la actividad inhibitoria frente a bacterias patógenas resistentes a los antibióticos, sin embargo, se requieren aún de más estudios para saber la naturaleza química de los metabolitos extraídos, aunque se conoce que los *Streptomyces* producen generalmente compuestos antibióticos relacionados a los grupos macrólidos, poliéteres, polienos, entre otros (37,38). En promedio las zonas de inhibición obtenidas en este trabajo fluctuaron entre 8 a 18 mm de diámetro, dichos resultados pueden ser comparados con el trabajo de Ravikumar et al, 2010 en donde extractos de metabolitos secundarios concentrados con acetato de etilo de actinobacterias aisladas de esponjas y sedimento marino mostraron halos de inhibición desde 7 a 10 mm de diámetro en pruebas de antagonismo con patógenos resistentes aislados de humanos usando el método de difusión con discos (15), mientras que el estudio de Pushpa Rani et al.(10) utilizando una proteína purificada extraída de actinobacterias marinas y mediante el método de difusión en agar (Pocillos), reportó también la formación de zonas de inhibición entre 7 a 12 mm al ser enfrentadas a patógenos humanos.

En contraste al estudio de Cita et al (2017) que analizaron bacterias patógenas Gram-negativas y Gram-positivas(32), en el presente trabajo solo se realizaron pruebas con bacterias Gram-negativas, mostrando que la mayoría de las cepas de actinobacterias testadas fueron capaces de inhibir gran parte de las cepas patógenas Gram-negativas.

Las bacterias Gram-negativas son conocidas por su impresionante número de mecanismos de resistencia hacia antibióticos, entre ellas cabe mencionar la modificación enzimática del antibiótico, el uso de bombas de expulsión, cambios en la permeabilidad de su membrana, etc. y son responsables de la mayor parte de casos de hospitalizaciones críticas(39). De acuerdo a Berdy et al (40), muchos de los compuestos que provienen de actinobacterias marinas son exclusivamente efectivas frente bacterias Gram-positivas, mientras que solo un pequeño porcentaje son efectivas frente a bacterias Gram-negativas. Es por esto, que el interés del presente trabajo está enfocado a la búsqueda de nuevos metabolitos que muestren efectividad de amplio espectro frente a patógenos con un amplio rango de patrones de resistencia ante a conocidos antibióticos, en este caso la cepa RFE02 fue capaz de inhibir todas las cepas clínicas Gram-negativas resistentes a los antibióticos con que se enfrentó, mostrando su gran potencial de convertirse en un producto natural novedoso.

De manera adicional en el presente trabajo se realizaron también experimentos de inducción para incrementar la producción de metabolitos secundarios en la cepa RFE02. Esto se logró mediante el cambio en las concentraciones de un nutriente esencial. En este caso se utilizó la glucosa en una gradiente entre 100% a 0% de concentración en el medio de cultivo, este compuesto energético es utilizado en casi todas las rutas metabólicas conocidas. Nuestros resultados indicaron que, al reducir la concentración de este componente sin necesariamente eliminarlo por completo del caldo de cultivo, este puede estimular una mejor producción de metabolitos secundarios. Se sabe que las condiciones de fermentación así como la composición y concentración de diversos componentes del medio en el que las actinobacterias se desarrollan podrían incrementar o disminuir la producción de metabolitos secundarios (6,41,42). Esta producción está ligada a la presencia de ciertos precursores y cofactores los cuales provienen del metabolismo primario y estos deben ser suficientes para iniciar la biosíntesis y productividad de los metabolitos secundarios (43). De acuerdo a Bilyk y Luzhetskyy (44) los metabolitos secundarios están en pequeñas proporciones suficiente para crear una ventaja al hospedero pero no son esenciales para su crecimiento, por lo cual conocer los mecanismos de inducción en su producción podría ser importante para una producción a escala industrial. Por esto la optimización del medio de cultivo es

importante para garantizar la disponibilidad de los precursores y esto pueda incrementar la producción de los metabolitos de 2 a 7 veces (44–46). Las condiciones de fermentación en nuestro caso fueron acorde al método de “Shake flask”, resultando en que la mayoría de las cepas evaluadas presentaron actividad antagonista. El presente trabajo puede ser contrastado con el estudio de Manisha et al (47), en donde este método de fermentación no produjo metabolitos con actividad alguna en actinobacterias aisladas del ambiente marino, sin embargo si obtuvieron resultados prometedores al utilizar la técnica de “Agar surface fermentation method” al enfrentarlos con bacterias patógenas. Esto evidencia que cada cepa de las actinobacterias posee sus propios requerimientos en cuanto al modo en que se cultiva y el método fermentativo elegido para producir metabolitos secundarios, por lo que es posible que las cepas que mostraron poca o nula actividad antagonista en el presente estudio, en condiciones de fermentación óptimas podrían presentar una mejor actividad antagonista.

En cuanto a los valores de CMI, estos oscilaron entre 7.01 y 14.02 $\mu\text{g/ml}$ para la cepa RFE02 por lo que resultan prometedores para posteriores estudios de optimización, estos resultados pueden ser comparados con otras sustancias producidas por otras especies del género *Streptomyces* como la Essramycina la cual mostró una gran actividad antibacteriana frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas con un CMI entre 2-8 $\mu\text{g/ml}$ (48) o con los trabajos de León et al. en el cual la cepa de actinobacteria M10-77 exhibió un CMI de 7.9-31.7 $\mu\text{g/ml}$ frente a *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes y *Enterococcus faecalis* vancomicina resistentes (33).

Mugil cephalus es una especie de pez marino que vive en ambientes costeros marinos y estuarinos y que está relacionado a fondos arenosos y lodosos, siendo su forma de alimentación mediante un mecanismo de succión de la capa superior del sedimento (49). En la revisión de Wang AR, se menciona que el microbioma gastrointestinal de peces está compuesto básicamente de grupos de bacterias como Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Firmicutes y Fusobacterium, estos grupos varían de acuerdo a la especie y a las condiciones ambientales y al tipo de alimentación (50), además se sabe que los sedimentos marinos están constituidos en un buen porcentaje por biomasa bacteriana, siendo estos sustratos una fuente rica en compuestos

bioactivos (16). Por lo expuesto se puede conjeturar que en base a la alimentación de esta especie y al ambiente que frecuenta, se podría encontrar en su sistema digestivo una gran variedad de microorganismos entre ellos las actinobacterias muchas de ellas con la capacidad de producir diferentes compuestos bioactivos novedosos, por lo que futuros estudios sobre la dinámica del microbioma gastrointestinal de los peces marinos serán necesarios. El presente estudio es el primero en evaluar la actividad antagonista contra patógenos clínicos de las actinobacterias presentes en el tracto digestivo de *Mugil cephalus* en el país, sin embargo otros estudios también han sido realizados en actinobacterias aisladas de la misma especie para otras regiones, en esos casos se evaluaron otros parámetros tales como la actividad enzimática de L-glutaminasa(51), celulasa(52) y α -galactosidase, mostrando resultados prometedores, por ello las cepas de actinobacterias aisladas en este estudio también podrían tener el mismo potencial de producir una variedad de enzimas de importancia para la industria.

En conclusión, el tracto digestivo de *M. cephalus* presenta una microbiota cultivable que podría ser una fuente novedosa de metabolitos secundarios antibacterianos que tendrían la capacidad de inhibir patógenos clínicos drogo-resistentes. La cepa RFE02 requiere de un estudio más profundo en cuanto a su fisiología con la finalidad de optimizar la producción de metabolitos secundarios. Se recomienda realizar pruebas con diferentes parámetros fermentativos y optimización de la producción de metabolitos secundarios utilizando un biorreactor. De esta manera se podría entender mejor su fisiología y aprovechar mejor su potencial. El desarrollo de mejores agentes terapéuticos para combatir la resistencia bacteriana a los antibióticos parte desde la exploración e investigación en ambientes prístinos y poco explorados, en este sentido el trato digestivo de los peces marinos podría representar un microcosmos interesante para futuras investigaciones.

AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento a Bachiller R. Farfán por el aislamiento, identificación y evaluación preliminar de las cepas de actinobacterias utilizadas en el presente estudio; al laboratorio de Microbiología Molecular y Genómica Bacteriana de la Universidad Científica del Sur por el apoyo y financiamiento de este proyecto; a la Dra. María Pons por proporcionar las cepas clínicas; a los docentes Alejandro Fukusaki y Oscar Reátegui

por facilitar los materiales e instrumentos necesarios para la extracción de metabolitos secundarios. Igualmente, mis reconocimientos a la magister Ulrike Tarazona y el Biólogo marino Raúl Olaechea por sus consejos y orientación durante la parte experimental de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Santana F. ¿Somos los responsables de la resistencia antimicrobiana? Revista Archivo Médico de Camagüey. 2014;18(6):588-90.
2. Cabrera CE, Gómez RF, Zúñiga AE. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. Colombia Médica [Internet]. 2007; 38(2). Disponible en: <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=28338208>
3. Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nature Medicine. 2004;10(12s):S122-9.
4. Poole K. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. Current opinion in microbiology. 2001;5(4):9.
5. Ganesan P, Reegan D, Rajendran H, Ignacimuthu S. Antimicrobial activity of some actinomycetes from Western Ghats of Tamil Nadu, India. Alexandria Journal of medicine. 2017;53(2):101-10.
6. Parada R, Marguet R, Vallejo M. Aislamiento y caracterización parcial de actinomicetos de suelos con actividad antimicrobiana contra bacterias multidrogo-resistentes. Revista Colombiana de Biotecnología. Rev colomb biotecnol [Internet]. 2017;19(2). Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/64098>
7. Vignesh A, Ayswarya S, Gopikrishnan V, Radhakrishnan M. Bioactive potential of actinobacteria isolated from the gut of marine fishes. INDIAN J MAR SCI. 2019;48(08):6.

8. Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim S-K. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiological Research*. 2014;169(4):262-78.
9. Lam KS. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Opinion in Microbiology*. 2006;9(3):245-51.
10. Rani TP KP, A D. Purification and Antibacterial Activity of Marine Actinomycetes against Human and Fish Pathogens. *Journal of Marine Science: Research & Development* [Internet]. 2016; 06(06). Disponible en: <https://www.omicsonline.org/open-access/purification-and-antibacterial-activity-of-marine-actinomycetes-against-humanand-fish-pathogens-2155-9910-1000215.php?aid=82821>
11. Fernández Pérez MD, Hernández Balmaseda I, Regueira Betancourt SM. Bioactivos marinos en el tratamiento del cáncer. *Rev Electrónica Dr Zoilo E Marinello Vidaurreta*. 2015;40(7):10.
12. Evangelista-Martínez Z. Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos. 2007;11(3):15.
13. Kamjam M, Sivalingam P, Deng Z, Hong K. Deep Sea Actinomycetes and Their Secondary Metabolites. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2017;8. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00760/full>
14. Bentley SD, Chater KF, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). 2002;417:7.
15. Ravikumar S, Krishnakumar S, Inbaneson SJ, Gnanadesigan M. Antagonistic activity of marine actinomycetes from Arabian Sea coast. 2010;8.
16. Solanki R, Khanna M, Lal R. Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian J Microbiol*. 2008;22.
17. Abdelmohsen UR, Pimentel-Elardo SM, Hanora A, Radwan M, Abou-El-Ela SH, Ahmed S, et al. Isolation, Phylogenetic Analysis and Anti-infective Activity Screening of Marine Sponge-Associated Actinomycetes. *Marine Drugs*. 2010;8(3):399-412.
18. Ward AC, Bora N. Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Current Opinion in Microbiology*. 2006;9(3):279-86.
19. Ramesh S, Mathivanan N. Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2009;25(12):2103-11.
20. Penesyan A, Marshall-Jones Z, Holmstrom C, Kjelleberg S, Egan S. Antimicrobial activity observed among cultured marine epiphytic bacteria reflects their potential

- as a source of new drugs: Antimicrobial-producing epiphytic bacteria. FEMS Microbiology Ecology. 2009;69(1):113-24.
21. Sanchez LM, Wong WR, Riener RM, Schulze CJ, Linington RG. Examining the Fish Microbiome: Vertebrate-Derived Bacteria as an Environmental Niche for the Discovery of Unique Marine Natural Products. Gilbert JA, editor. PLoS ONE. 2012;7(5):e35398.
 22. Karthiga Rani M, Chelladurai G, Jayanthi G. Isolation and identification of bacteria from marine market fish *Scomberomorus guttatus* (Bloch and Schneider, 1801) from Madurai district, Tamil Nadu, India. Journal of Parasitic Diseases. 2016;40(3):1062-5.
 23. Sr SK, Rao KVB. In-vitro antimicrobial activity of marine actinobacteria against multidrug resistance *Staphylococcus aureus*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2012;2(10):787-92.
 24. Wink J. Laboratory studies: Actinobacteria, taxonomic evaluation and microbial drug screening. 2014.
 25. Meena B, Rajan L, Vinithkumar N, Kirubakaran R. Novel marine actinobacteria from emerald Andaman & Nicobar Islands: a prospective source for industrial and pharmaceutical byproducts. BMC Microbiol. 2013;13(1):145.
 26. Chaudhary H, Gopalan N, Shrivastava A, Singh S, Singh A, Yadav J. Antibacterial activity of actinomycetes isolated from different soil samples of Sheopur (A city of central India). J Adv Pharm Tech Res. 2013;4(2):118.
 27. Bagul US, Sivakumar SM. Antibiotic Susceptibility Testing: A review on current practice. 2016;6(3):8.
 28. Chen Y-H, Kuo J, Sung P-J, Chang Y-C, Lu M-C, Wong T-Y, et al. Isolation of marine bacteria with antimicrobial activities from cultured and field-collected soft corals. World J Microbiol Biotechnol. 2012;28(12):3269-79.
 29. Garcia A, Rhoden SA, Bernardi-Wenzel J, Orlandelli RC, Azevedo JL, Pamphile J. A. Antimicrobial Activity of Crude Extracts of Endophytic Fungi Isolated from Medicinal Plant *Sapindus saponaria* L. J App Pharm Sci [Internet]. 2012; Disponible en: http://www.japsonline.com/abstract.php?article_id=662
 30. Elibol M, Mavituna F. Effect of sucrose on actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2). Process Biochemistry. marzo de 1998;33(3):307-11.
 31. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0, 2020. [Internet]. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Disponible en: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/

32. Cita YP, Suhermanto A, Radjasa OK, Sudharmono P. Antibacterial activity of marine bacteria isolated from sponge *Xestospongia testudinaria* from Sorong, Papua. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2017;7(5):450-4.
33. León J, Aponte JJ, Rojas R, Cuadra DI, Ayala N, Tomás G, et al. Estudio de actinomicetos marinos aislados de la costa central del Perú y su actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* Meticilina resistentes y *Enterococcus faecalis* Vancomicina resistentes. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2011;10.
34. Stoesser N, Batty EM, Eyre DW, Morgan M, Wyllie DH, Del Ojo Elias C, et al. Predicting antimicrobial susceptibilities for *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates using whole genomic sequence data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013;68(10):2234-44.
35. Vimal V, Rajan BM, Kannabiran K. Antimicrobial Activity of Marine Actinomycete, *Nocardiosis* sp. VITSVK 5 (FJ973467). 2009;7.
36. Srivibool R, Sukchotiratana M. Bioperspective of actinomycetes isolates from coastal soils: A new source of antimicrobial producers. 2006;7.
37. Sun Y, Zhou X, Liu J, Bao K, Zhang G, Tu G, et al. '*Streptomyces nanchangensis*', a producer of the insecticidal polyether antibiotic nanchangmycin and the antiparasitic macrolide meilingmycin, contains multiple polyketide gene clusters. *Microbiology*. 2002;148(2):361-71.
38. Bado I, Cordeiro N, García V, Robino L, Seija V, Vignoli R. Principales grupos de antibióticos [Internet]. Disponible en: <http://higiene1.higiene.edu.uy/DByV/Principales%20grupos%20de%20antibi%F3ticos.pdf>
39. Tafur JD, Torres JA, Villegas MV. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. 2008;(3):10.
40. Bérdy J. Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Antibiotics*. 2005;58(1):1-26.
41. Uzcátegui M del C, Serrano JA, Panizo MM. Condiciones de cultivo que fomentan la producción de sustancias antimicrobianas en actinomicetos patógenos y del suelo. *RSVM*. 2013;33(2):134-9.
42. Fayza K, Amal A-A, Hala K-H. Antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. isolated from the gulf of Aqaba-Jordan and screening for NRPS, PKS-I, and PKS-II genes. *Afr J Biotechnol*. 2014;13(34):3505-15.
43. Tan G-Y, Liu T. Rational synthetic pathway refactoring of natural products biosynthesis in actinobacteria. *Metabolic Engineering*. 2017;39:228-36.

44. Bilyk O, Luzhetskyy A. Metabolic engineering of natural product biosynthesis in actinobacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. 2016;42:98-107.
45. Yi JS, Kim M, Kim S-J, Kim B-G. Effects of Sucrose, Phosphate, and Calcium Carbonate on the Production of Pikromycin from *Streptomyces venezuelae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2015;25(4):496-502.
46. Turło J, Gajzlerska W, Klimaszewska M, Król M, Dawidowski M, Gutkowska B. Enhancement of tacrolimus productivity in *Streptomyces tsukubaensis* by the use of novel precursors for biosynthesis. *Enzyme and Microbial Technology*. 2012;51(6-7):388-95.
47. Manisha M, Mithali J, Vijayalakshmi G, Gopikrishnan V, Masilamaniselvam M, Radhakrishnan M. Bioprospecting of actinobacteria from the Andaman marine ecosystem: Isolation, antagonistic potential, and taxonomy of potential strain. *INDIAN J MAR SCI*. 2019;48(08):7.
48. El-Gendy MMA, Shaaban M, Shaaban KA, El-Bondkly AM, Laatsch H. Essramycin: A First Triazolopyrimidine Antibiotic Isolated from Nature†. *J Antibiot*. 2008;61(3):149-57.
49. FAO. FAO Fisheries & Aquaculture - Cultured aquatic species fact sheets - *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758) [Internet]. 2018. Disponible en: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mugil_cephalus/es
50. Wang AR, Ran C, Ringø E, Zhou ZG. Progress in fish gastrointestinal microbiota research. *Rev Aquacult*. 2018;10(3):626-40.
51. Sahu MK, Poorani E, Sivakumar K, Thangaradjou T, Kannan L. Partial purification and anti-leukemic activity of L-asparaginase enzyme of the actinomycete strain LA-29 isolated from the estuarine fish, *Mugil cephalus* (Linn.). 2007;7.
52. Murugan M, Srinivasan M, Sivakumar K, Sahu MK, Kannan L. Characterization of an actinomycete isolated from the estuarine finfish, *Mugil cephalus* Lin. (1758) and its optimization for cellulase production. 2007;66:6.

Tabla 1. Cepas de actinobacterias aisladas del tracto digestivo de *Mugil cephalus* utilizadas para las pruebas de antagonismo frente a cepas patógenas clínicas con distintos perfiles de resistencia.

Cepa ID	Especie relacionada	Tamaño pb	% Similaridad
RFA01	<i>Streptomyces qinglanensis</i> strain 172205	>1000	97%
RFA03	<i>Streptomyces litoralis</i> strain TRM 46515	>1000	98%
RFC04	<i>Streptomyces flocculus</i> strain NBRC 13041	>1000	99%
RFC05	<i>Streptomyces smyrnaeus</i> strain SM3501	>1000	98%
RFC07	<i>Streptomyces iranensis</i> strain HM 35	>1000	99%
RFC08	<i>Streptomyces xinghaiensis</i> strain S187	>1000	100%
RFE02	<i>Streptomyces qinglanensis</i> strain 172205	>1000	98%
RFE04	<i>Streptomyces qinglanensis</i> strain 172205		99%
RFE05	<i>Streptomyces qinglanensis</i> strain 172205		99%
RFE06	<i>Streptomyces xinghaiensis</i> strain S187	>1000	99%
RFF04	<i>Streptomyces fenghuangensis</i> strain GIMN4.003	>1000	99%
RFF10	<i>Streptomyces barkulensis</i> strain RC 1831	>1000	99%
RFF12	<i>Streptomyces gougerotii</i> strain NBRC 13043	>1000	100%
RFF13	<i>Streptomyces albus</i> strain NRRL B-1811	>1000	99%
RFF15	<i>Streptomyces sclerotialus</i> strain DSM 43032	>1000	98%
RFG04	<i>Streptomyces mangrovi</i> strain HA11110	>1000	98%
RFG22	<i>Streptomyces sedi</i> strain YIM 65188	>1000	97%
RFG24	<i>Streptomyces thermoatroviridis</i> strain NBRC 14276	>1000	96%
RFG27	<i>Streptomyces zhaozhouensis</i> strain NEAU-LZS-5	>1000	99%
RFA05	<i>Saccharopolyspora cebuensis</i> strain SPE 10-1	>1000	99%
RFG06	<i>Saccharomonospora azurea</i> strain NA128	>1000	99%
RFG16	<i>Saccharomonospora cyanea</i> strain NA-134	>1000	98%

Tabla 2. Cepas patógenas clínicas de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* y sus diferentes perfiles de resistencia hacia antibióticos utilizadas para pruebas de antagonismo frente a actinobacterias aisladas del tracto digestivo de *Mugil cephalus*.

Antibiótico	<i>Klebsiella pneumoniae</i>						<i>Escherichia coli</i>				
	1K	42K	26K	32K	79K	20K	1.9E	1.1E	1BLEE	10BLEE	11BLEE
Meropenem (MEM10)	S	S	S	S	R	S	S	S	-	-	-
Impimenem (IPM10)	R	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R
Aztreonam (ATM)	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S
Amoxicilina/Ac. Clavulánico (AMC)	R	S	S	R	R	R	S	S	-	R	I
Piperacilina/tazobactam (10:1)	R	R	S	S	R	S	-	-	-	-	-
Cloranfenicol(C30)	S	S	S	R	I	S	-	-	-	-	-
Sulfametoxazol (SXT)	R	R	R	R	R	R	R	R	-	R	R
Nitrofurantoina(F300)	R	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S
Tigeciclina (TGC15)	R	I	R	R	R	R	-	-	-	R	R
Levofloxacina (LEV5)	S	S	I	S	R	I	S	S	R	-	-
Ciprofloxacina (CIP5)	S	I	R	S	R		S	S	-	R	R
Norfloxacina (NOR)	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	S
Cefotaxima (CTX30)	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R
Ceftazidima (CAZ30)	R	I	R	S	R	R	S	S	R	R	R
Cefepima (FEP)	-	-	-	-	-	-	S	I	R	R	R
Cefoxitina (FOX)	-	-	-	-	-	-	S	S	R	R	S
Ceftriaxona (CRO)	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	S
Gentamicina (CN10)	R	S	R	S	R	R	S	S	R	R	S
Amikacina (AMK30)	I	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S
Rifampicina (RIF)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R

R: Resistencia, S: Sensible, I: Intermedio, -: No posee pruebas de antibiograma

Tabla 3. Resultados de la prueba de antagonismo primaria de cepas de actinobacterias aisladas del tracto digestivo de *Mugil cephalus* frente a cepas patógenas clínicas con diferentes perfiles de resistencia (halos de inhibición expresados en mm de diámetro con el método difusión en agar).

Cepas (código)	Halos de inhibición (mm)											<i>E. coli</i> K.	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>						<i>Escherichia coli</i>					ATCC 25922	ATCC 13883
	1K	42K	26K	32K	79K	20K	1.9E	1.1E	1BLEE	10BLEE	11BLEE		
RFE02	4	6.7	8	2.7	6.7	4.7	2	6	4	9.3	6.7	2	2
RFE04	4	8	6.7	4	*	6.7	*	2	3.3	-	2	4	4
RFE05	4	5.3	6	2	-	8.7	-	-	-	-	2	2	2
RFE06	2.7	4	6	2.7	2	2.7	*	*	2	-	*	4	4
RFF04	2	4	6	5.3	1.3	4.7	*	2	-	-	*	4	4
RFF10	2	4	2	4	2	4.7	-	2	-	-	-	4	4
RFF12	2.7	4	-	5.3	2	4	2	2	-	-	*	4	4
RFF13	2	3.3	4.7	2	-	3.3	-	-	-	-	-	2	2
RFF15	2	4	2.7	2	-	2	-	-	-	-	-	2	2
RFG24	2	2.7	6.7	2.7	-	-	-	-	-	-	-	11.3	2
RFG04	2	13.3	6	3.3	-	6.7	-	-	-	-	-	2	2
RFA05	2	4	2.7	2	-	2	-	-	-	-	-	2	2
RFG06	2	6	6	2.7	-	4	-	-	-	2	-	2	2
RFA01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RFA03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RFC04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RFC05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RFC07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RFC08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RFG22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RFG27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RFG16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: No hay actividad antagonista; *: Valores menores a 2 mm. (Valores promedio de 3 repeticiones).

Tabla 4. Resultados de la prueba de antagonismo secundaria de los extractos orgánicos de *Streptomyces qinglanensis*, cepa RFE02 con diferentes concentraciones de glucosa en el medio de fermentación frente a cepas patógenas clínicas con distintos perfiles de resistencia (halos de inhibición expresados en mm de diámetro con el método de difusión en agar).

Cepas clínicas	100%	50%	25%
1K	10	9	12
42K	10	9	13
26K	3	6	9
32K	6	4	8
79K	6	6	9
20K	6	7	10
1.9E	4	4	11
1.1E	6	7	10
1BLEE	12	12	18
10BLEE	12	11	15
11BLEE	9	11	14
<i>K. pneumoniae</i>			
ATCC 13883	4	4	6
<i>E. coli</i> ATCC			
25922	2	2	3

(Valores promedio de 3 repeticiones)

Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria del extracto orgánico de *Streptomyces qinglanensis*, cepa RFE02, frente a cepas patógenas clínicas.

Cepas	CMI (µg/ml)
42k	7.01
26k	14.02
79k	14.02
10BLEE	7.01
1.9E	7.01
1.1E	7.01

<i>K. pneumoniae</i>	
ATCC 13883	14.02
<i>E. coli</i> ATCC 25922	14.02

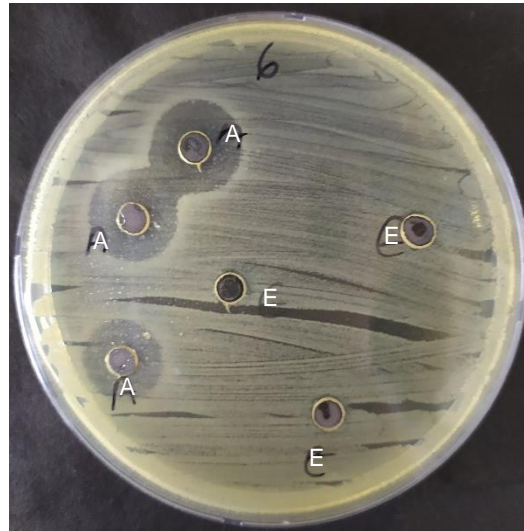


Figura 1. Formación de halos de inhibición de la prueba primaria de antagonismo de actinobacterias aisladas del tracto digestivo de *Mugil cephalus* frente a cepas patógenas clínicas. (A) cepa RFE02, (B) cepa RFA03.



Figura 2. Formación de halos de inhibición en la prueba secundaria de antagonismo de *Streptomyces qinglanensis*, cepa RFE02 frente a cepas patógenas clínicas.

