



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

Luz Adriana Betancur Jaramillo

Universidad Nacional de Colombia
Facultad, Departamento de Química
Bogotá, Colombia

2018

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

Luz Adriana Betancur Jaramillo

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctora en Ciencias – Química

Director:

Freddy Alejandro Ramos Rodríguez Ph.D.

Línea de investigación en microbiología marina

Estudio y aprovechamiento de productos naturales marinos y frutas de Colombia

Universidad Nacional de Colombia

Facultad, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2018

A mi familia

Agradecimientos

Primero mi total agradecimiento a mi familia a quienes hoy agradezco que hicimos este camino juntos y de la mano. Especialmente a mi madre Liz, a mis hermanos Viviana y Juan Pablo, son un soporte de amor, alegría y cariño; a mi hijo Sebastián, mi razón de ser. Gracias hijo por existir en mi vida, gracias por comprender mis ausencias, gracias por tu amor y por expresarlo en cada llamada, te amo profundamente. Gracias a Dios por darme la fuerza cuando sentí pesada la carga, por enseñarme “que cuando el camino se hace duro, los duros permanecemos en el camino y llegamos hasta el final”, gracias por todas estas maravillosas personas que traes a mi vida, por sus enseñanzas, por su amistad y compañía.

Agradezco a Colciencias por otorgarme la beca que permitió llevar a cabo mis estudios doctorales (567) y por la financiación del proyecto (Cod. 1101-659-44402. CT.537/14). A la Universidad de Caldas por la comisión de estudios otorgada.

A la Universidad Nacional de Colombia por la formación recibida, a la DIB por el proyecto financiado (Hermes 23604) y a la IFS por la financiación del proyecto (F/5023-2).

A la ANLA y el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible por otorgar el permiso de colecta y permitirnos llevar esta investigación (Permiso No. 4 de 10/02/2010, Anexo 2, Contrato de Acceso a Recurso Genético No. 108).

Agradezco a mi director y profesor Ph.D Freddy Alejandro Ramos R. por su compromiso y dedicación en nuestro trabajo, gracias por su acogida, por su alto grado de exigencia y por su ejemplo.

Al profesor Ph.D Leonardo Castellanos H., su calidad humana y su amabilidad fueron una voz de aliento en los momentos difíciles. Gracias a todos y cada uno de los integrantes del grupo de investigación “Estudio y aprovechamiento de productos naturales marinos y frutas de Colombia” muy especialmente a Sandra Judith Naranjo con quien compartimos largas jornadas

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

de trabajo y café. Diana Marcela Vinchira y Abel Mateo Forero mil y mil gracias, su apoyo incondicional fue determinante en la culminación de este trabajo. Tener la oportunidad de ser parte de este equipo de profesionales y de seres humanos comprometidos con la investigación es un privilegio; asumo mi compromiso de duplicar este conocimiento en mi tierra chica, Manizales y en mi Universidad de Caldas. Por siempre mi gratitud, mi reconocimiento para todos y cada uno de los marineros que con sus aportes han enriquecido de manera increíble mis conocimientos y experiencia.

Agradecimientos especiales a la profesora Ph.D. Monica Tallarico P. y a todos los integrantes de su grupo de investigación “Laboratorio de Química de Microorganismos” por todo el apoyo y colaboración durante la pasantía de investigación en la USP (Ribeirao Preto-Brasil), me hicieron sentir en casa, los llevo en mi corazón.

Agradecimientos al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional (IBUN) especialmente a la Profesora Nubia Moreno por permitirnos hacer uso de sus laboratorios y equipos de la manera más amable.

Mil gracias a Ph.D Zulma Rocio Suárez por su gran conocimiento, por su ayuda y por el tiempo que me dedicó desde el inicio de este trabajo.

Al profesor Ph.D Alejandro Acosta, A la profesora Ph.D Monica Puyana, por el apoyo brindado. Al Ph.D Elkin Galeano y a la Msc Katerin Jaramillo por su apoyo en la toma de espectros de RMN, A Federico Padilla y a Viviana Zuluaga quienes con sus aportes han enriquecido este trabajo y hemos creado lazos de trabajo, conocimientos y experiencia gracias por ello.

A mis compañeros del Departamento de Química de la Universidad de Caldas mi gratitud por siempre.

A la Doctora Miryam Peraza gracias por cuidar de mi salud y por su voz de aliento en cada cita. A la señora Dora Isabel y su familia que nos recibieron a nuestra llegada, su apoyo y cariño hicieron llevaderos los momentos difíciles del inicio de este camino

Hoy al final de este recorrido de sacrificios, esfuerzo y trabajo arduo, pero sobre todo de un viaje maravilloso a un mundo de conocimiento y experiencia, simple y sencillamente me queda decir VALIO LA PENA.

Resumen

La agricultura a nivel mundial enfrenta dificultades por la presencia de gran cantidad de fitopatógenos, condición a la cual no es ajeno nuestro país. La forma tradicional de enfrentar esta problemática ha sido con el uso de plaguicidas de origen sintético aplicados extensamente en diversos cultivos. Los plaguicidas sintéticos presentan efectos nocivos a nivel toxicológico y favorecen el surgimiento de cepas resistentes a estos tratamientos. Una de las alternativas para reemplazar estos plaguicidas, es el uso de microorganismos que puedan actuar o bien como productores de metabolitos secundarios activos, o que puedan actuar como agentes de biocontrol de los fitopatógenos.

Buscando aportar al conocimiento de la diversidad metabólica ofrecida por los microorganismos marinos, en particular por las actinobacterias, una temática relativamente nueva a nivel mundial y muy poco explorada en Colombia, se presenta en esta tesis doctoral la obtención de una colección de actinobacterias aisladas de ambientes marinos del Caribe colombiano y la exploración de su potencial como fuente de compuestos para el control de fitopatógenos.

Como un primer resultado, se logró la obtención de una colección de 203 microorganismos aislados de muestras recolectadas en ambientes marinos. Esta colección representa una de las pocas colecciones especializada en microorganismos de estos ambientes que hay en el país, la cual contribuye a la caracterización de la microbiota colombiana. Los resultados de la caracterización de la colección de microorganismos permitieron identificar 24 aislamientos pertenecientes al Phylum *Actinobacteria*, los cuales fueron caracterizados por pruebas bioquímicas, morfológicas, por la caracterización de la producción de ácidos diaminopimélicos, la secuenciación del gen 16S rRNA y por el perfil proteico obtenido por MALDI-TOF. Los resultados indicaron que los 24 aislamientos se encuentran filogenéticamente relacionados al Phylum *Actinobacteria* y están representados por los

géneros *Streptomyces* (22 aislamientos), *Gordonia* (un aislamiento, PNM-25) y *Micromonospora* (un aislamiento, PNM-102N).

Los extractos orgánicos y acuosos de la colección fueron evaluados como fuente de compuestos con actividad antibacteriana y antifúngica frente a las bacterias *Burkholderia plantarii* ATCC 43733, *Burkholderia glumae* ATCC 33617 y *Burkholderia gladioli* CIAT 3704-1 (patógenas del cultivo del arroz), frente a los hongos *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* raza 2 (patógeno de clavel) y *Colletotrichum gloeosporioides* 26B (patógeno del ñame). Así, se logró identificar aislamientos con actividad de amplio espectro, algunos extractos como el obtenido de *Streptomyces* sp. PNM-161a logró controlar a 3 de los 5 patógenos evaluados, y extractos como el obtenido de *Streptomyces* sp. PNM-5, mostró una alta especificidad por el control de solo uno de los fitopatógenos evaluados.

El perfilado metabólico de los 24 aislamientos de actinobacterias empleando HCA, OPLS-DA y la estrategia del barcoding permitió evaluar la diversidad metabólica de los extractos orgánicos, encontrando aislamientos de alta diversidad metabólica como *Streptomyces* sp. PNM-208, a la vez que se encontraron aislamientos como *Streptomyces* sp. PNM-9, de baja diversidad química.

Se realizó una propuesta de integración de la información metabólica, taxonómica y de actividad biológica, la cual, en conjunto con los procesos de derreplicación, nos permitió generar criterios de selección de algunos de los aislamientos (*Streptomyces* sp. PNM-161a, *Streptomyces* sp. PNM-208, *Streptomyces* sp. PNM-9, *Streptomyces* sp. PNM-182 y *Streptomyces* sp. PNM-5), para realizar la búsqueda de compuestos para el control de fitopatógenos. Con esta información, se abordó el estudio de los compuestos producidos por tres de ellas *Streptomyces* sp. PNM-9, *Streptomyces* sp. PNM-161a, *Streptomyces* sp. PNM-208.

El estudio del extracto orgánico de *Streptomyces* sp. PNM-161a, aislamiento recuperado de una muestra de *Bryopsis* sp., permitió el aislamiento y la identificación de dos tetrapéptidos cíclicos identificados como *ciclo*-[L-Phe-L-Pro-L-Leu-L-Pro] **5.1** y *ciclo*-[L-Phe-L-Pro-L-Ile-L-Pro] **5.2**, junto con 5 dicetopiperazinas (DKPs). La estructura de los compuestos fue elucidada por RMN mono y bidimensional, MS y por comparación con los datos reportados en literatura. La configuración absoluta de los tetrapéptidos se determinó mediante el método de Marfey. La

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

evaluación de la actividad para el control de los fitopatógenos mostró que los compuestos más activos fueron el péptido **5.1** (*B. gladioli* MIC = 0.068 mM; *B. glumae* MIC = 1.1 mM) y la dicetopiperazina *ciclo*-[L-Pro-L-Leu] compuesto **5.5** (*B. gladioli* MIC = 0.3 mM; *B. glumae* MIC = 2.4 mM), además de otros compuestos con actividad moderada. Los compuestos **5.1** y **5.2** mostraron inhibir la germinación de los conidios de *Colletotrichum gloeosporioides* en un 65% y un 50% respectivamente, lo cual permitió identificar a estos tetrapéptidos como los compuestos responsables de la actividad observada en el extracto crudo de *Streptomyces* sp. PNM-161a.

El estudio químico del extracto orgánico de *Streptomyces* sp. PNM-208, aislamiento recuperado de una muestra del octocoral *Eunicea fusca*, permitió el aislamiento e identificación de seis antimicinas identificadas como la urauchimicina A (**6.1**), urauchimicina C (**6.2**), deisovaleril blastmicina (**6.3**), antimicina A_{6a} (**6.4**), antimicina A_{5a} (**6.5a**), antimicina A_{5b} (**6.5b**) y dos dicetopiperazinas, la brevinamida F (**6.6**) y la *ciclo*-[L-Phe-L-Pro] (**6.7**). La estructura de los compuestos fue elucidada por RMN mono y bidimensional, MS y por comparación con los datos reportados en literatura. Como resultado de la evaluación de la actividad antifúngica se encontró que todas las antimicinas, excepto **6.2** mostraron actividad inhibitoria de la germinación de conidios del hongo fitopatógeno *C. gloeosporioides* con un porcentaje de germinación entre 0 y 4 %. Las dos DKP evaluadas no mostraron inhibir la germinación de conidios. Este ensayo permitió determinar que las antimicinas son los compuestos responsables de la actividad observada en el extracto de *Streptomyces* sp PNM-208.

El perfilado metabólico por RMN de la cepa *Streptomyces* sp. PNM-9, recuperada de una muestra de algas del género *Dictyota*, permitió correlacionar su actividad biológica contra los fitopatógenos del arroz *B. glumae* y *B. gladioli* con su producción metabólica a través de herramientas de análisis multivariado. Los compuestos 2-metil-N-(2'-feniletíl)-butanamida (**7.1**) y la 3-metil-N-(2'-feniletíl)-butanamida (**7.2**), fueron identificados a partir del extracto en medio TSB y LB a los 15 días de cultivo a través de experimentos monodimensionales de RMN. Estos compuestos fueron posteriormente aislados de *Streptomyces* sp. PNM-9 en medio

TSB y sus estructuras fueron confirmadas con los datos de RMN 1D, 2D y MS. Estos dos compuestos, presentaron una MIC de 2.43 mM y 1.21 mM, respectivamente.

Esta investigación representa una primera aproximación para establecer el potencial biotecnológico de la colección de actinobacterias aisladas de ambientes marinos para su uso en el control de fitopatógenos, contribuyendo además con la caracterización de la diversidad química de algunos de los aislamientos mas promisorios, cuyos compuestos pueden ser usados para el control de fitopatógenos.

Palabras clave: Productos naturales marinos, actinobacterias marinas, control de fitopatógenos, perfilado metabólico, tetrapéptidos ciclicos, dicetopiperazinas *DKPs*, antimicinas, feniletilamidas.

Abstract

Agriculture is currently being challenged by the presence of massive quantities of phytopathogens, an issue that represents also a concern to our country. Spreading synthetic pesticides on crops represent a traditional way of controlling phytopathogens, compounds that often exhibit toxic effects and promote the rising of resistant strains. An alternative to replace such products are microorganisms, they constitute an interesting strategy to combat phytopathogens because they either produce bioactive secondary metabolites or behave as biocontrol agents.

This work was aimed to contribute to the chemical study of the metabolic diversity of microorganisms from marine sources, particularly actinobacteria. This research field is recognized worldwide as young and promising, and has not been extensively explored in Colombia. Hence, in this doctoral dissertation is presented the isolation of a collection of actinobacteria strains from marine environments located at the Caribbean Sea, and its potential as a source of compounds for phytopathogens control.

First of all, starting from samples taken out from marine environments, a collection of 203 microorganisms was obtained and isolated, becoming into one of the main collections of microorganisms in our country, which largely contributes to the characterization of Colombian

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

marine diversity. Taxonomical classification of these microorganisms allowed us to identify 24 strains belonging to the *Actinobacteria* phylum. They were classified through biochemical tests, morphology, characterization of their diaminopimelic acids production, 16S rRNA gene sequencing and from the protein profile which was obtained by MALDI-TOF patterns. These 24 isolated *Actinobacteria* strains were distributed in *Streptomyces* (22 isolated strains), *Gordonia* (1 isolated strain, PNM-25) and *Micromonospora* (1 isolated strain, PNM-102N).

The organic and aqueous extracts from the collection were evaluated as a source of antibacterial and antifungal compounds, particularly against the bacteria *Burkholderia plantarii* ATCC 43733, *Burkholderia glumae* ATCC 33617 and *Burkholderia gladioli* CIAT 3704-1 (rice pathogens), or against the fungi *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* race 2 (Carnation pathogen) and *Colletotrichum gloeosporioides* 26B (Yam pathogen). The extracts from some isolated strains showed a remarkable bioactivity, for instance, *Streptomyces* sp. PNM-161a controlled 3 out of 5 pathogens. Furthermore, other extracts such as those obtained from *Streptomyces* sp. PNM-5 showed a higher specificity at controlling only one of the evaluated phytopathogens.

The organic extracts from the 24 isolated strains were analyzed through metabolic profiling employing HCA and OPLS-DA along with a barcoding strategy. Assessment of metabolic diversity in the extracts revealed some cases of isolated strains with high metabolic diversity and chemical profiles which are completely differentiated from other isolated strains such as those obtained from *Streptomyces* sp. PNM208. Other isolated strains such as *Streptomyces* sp. PNM-9 showed a low chemical diversity with a metabolic profile which is similar to its culture media.

An integral proposal comprising metabolomic information, taxonomy, biological activity and dereplication strategies, was constructed to select some of the strains (*Streptomyces* sp. PNM-161a, *Streptomyces* sp. PNM-208, *Streptomyces* sp. PNM-9, *Streptomyces* sp. PNM-182 and *Streptomyces* sp. PNM-5), to perform their study as sources of compounds for phytopathogen control. The information was employed to address the study of the compounds produced by *Streptomyces* sp. PNM-9, *Streptomyces* sp. PNM-161a, *Streptomyces* sp. PNM-208.

The chemical study of the organic extract obtained from *Streptomyces* sp. PNM-161a, recovered from a sample of *Bryopsis* sp., allowed us to isolate two cyclic tetrapeptides identified as *cyclo*-[L-Phe-L-Pro-L-Leu-L-Pro] **5.1** and *cyclo*-[L-Phe-L-Pro-L-Ile-L-Pro] **5.2** along with 5 cyclic diketopiperazines (*DKPs*). The structures were elucidated by 1D and 2D NMR, MS and comparison with reported data. The absolute configuration of the tetrapeptides was determined by Marfey's method. The bioactivity assays against the phytopathogens showed that compound **5.1** (*B. gladioli* MIC = 0.068 mM; *B. glumae* MIC = 1.1 mM) and the diketopiperazine *ciclo*-[L-Pro-L-Leu] **5.5** (*B. gladioli* MIC = 0.3 mM; *B. glumae* MIC = 2.4 mM) were the most active compounds. Some other compounds also exhibited moderate bioactivity. The compounds **5.1** and **5.2** showed 65% and 50% germination inhibition of the *Colletotrichum gloeosporioides* conidia, respectively. This test allowed to identify the tetrapeptides as the compounds responsible of the bioactivity observed in the crude extract of *Streptomyces* sp. PNM-161a

The chemical study of the organic extract from *Streptomyces* sp. PNM-208, a strain recovered from the soft coral *Eunicea fusca*, allowed us to isolate and identify 6 compounds known as antimycines, urauchimycin A (**6.1**), urauchimycin C (**6.2**), deisovaleryl blastmycin (**6.3**),), antimycin A_{6a} (**6.4**), antimycin A_{5a} (**6.5a**), antimycin A_{5b} (**6.5b**), and two *DPKs*, Brevinamide F (**6.6**) and *cyclo*-[L-Phe-L-Pro] (**6.7**). The structures were elucidated by 1D and 2D NMR, MS and comparison with reported data. The antifungal assays against *C. gloeosporioides* showed that all antimycines, excepting **6.2**, exhibited percentages of germination between 0 and 4% in most cases. Both *DKPs* evaluated did not show inhibition of conidial germination. This test allowed to establish that the antimycines are the compounds responsible for the activity observed in the extract of *Streptomyces* sp-208

Finally, the metabolic profiling by NMR of *Streptomyces* sp. PNM-9, recovered from the brown algae *Dictyota* sp., allowed to correlate the production of metabolites and the biological activity against *B. glumae* or *B. gladioli*. Through 1D NMR experiments analysis of the product obtained from the fermentation in TSB culture and LB after 15 days of growing, compounds 2-methyl-N-(2'-phenylethyl)-butanamide (**7.1**) and 3-methyl-N-(2'-phenylethyl)-butanamide (**7.2**) were identified in the organic extract. Those compounds were posteriorly isolated from *Streptomyces* sp. PNM-9 growth in TSB culture, and their structures were confirmed through

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

1D and 2D NMR, MS data and their comparison with literature. Furthermore, they exhibited MIC values of 2.43 mM and 1.21 mM, respectively.

This research constitutes the first approximation at establishing the biotechnological potential of our actinobacteria collection from marine sources, as phytopathogen controlling. The work contributes to the chemical diversity characterization of some of the most promising isolated strains, whose compounds can be used for phytopathogen-control.

Keyword: Marine natural products, marine actinobacteria, phytopathogenic control, metabolic profiling, cyclic tetrapeptides, diketopiperazines DKPs, antimycins, phenylethylamides.

Contenido

1. Actinobacterias marinas y su potencial aplicación en la agricultura.....	5
1.1 El impacto de los fitopatógenos en la agricultura	5
1.2 Estrategias para el control de fitopatógenos.....	7
1.3 Microorganismos marinos como fuente de compuestos	9
1.3.1. <i>Phylum Actinobacteria</i>	11
1.3.2 Actinobacterias aisladas de ambientes marinos	15
1.3.3 Actinobacterias marinas como fuente de compuestos bioactivos.....	16
1.3.4 Productos naturales de actinobacterias marinas como controladores de fitopatógenos.....	19
1.3.5 Estudio de microorganismos marinos en Colombia.....	21
2. Identificación de actinobacterias a partir de una colección de microorganismos aislados de ambientes marinos del mar Caribe colombiano.	24
2.1 Introducción.....	24
2.1.1 Las colecciones de microorganismos.....	26
2.1.2 Prospección biológica de microorganismos en Colombia.....	27
2.2 Resultados y discusión.....	29
2.2.1 Aislamiento de bacterias marinas	29
2.2.2 Caracterización de bacterias marinas.....	30
2.3 Conclusiones	45
2.4 Materiales y métodos	46
2.4.1 Muestreo de actinobacterias de ambientes marinos.....	46
2.4.2 Aislamiento de los microorganismos.....	47
2.4.3 Aislamiento en cultivo puro y preservación de las cepas.....	47
2.4.4 Identificación taxonómica de <i>Actinobacterias</i>	48
2.4.4.1 Caracterización bioquímica	48
2.4.4.2 Caracterización de ácidos diaminopimélicos	49
2.4.4.3 Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM).....	50
2.4.4.4 Identificación basada en caracteres moleculares y MALDI- TOF.....	50
3.Evaluación de la actividad contra fitopatógenos de 24 aislamientos de actinobacterias marinas	53
3.1 Introducción.....	53
3.2 Resultados y discusión.....	57
3.2.1 Resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana mediante enfrentamiento directo:.....	57
3.2.2 Resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos de las 24 cepas:.....	60
3.2.3 Resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos acuosos de las 24 cepas	61
3.3 Conclusiones	65
3.4 Materiales y métodos	66
3.4.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias marinas contra fitopatógenos.....	66
3.4.1.1 Cepas de los fitopatógenos.....	66
3.4.1.2 Ensayos antimicrobianos.....	66

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

3.4.1.3	Obtención del extracto orgánico y acuoso del cultivo de actinobacterias.....	67
3.4.1.4	Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de actinobacterias...	68
4.	Integración del perfilado metabólico la taxonomía y la bioactividad para la selección de actinobacterias como fuente de compuestos para el control de fitopatógenos	71
4.1	Introducción.....	71
4.2	Resultados y discusión.....	75
4.2.1	Evaluación de la producción metabólica de los extractos orgánicos de los 24 aislamientos marinos.....	75
4.2.2	Correlación del perfil metabólico con la actividad contra fitopatógenos.....	83
4.2.3	Priorización de los aislamientos para posteriores estudios químicos.....	89
4.3	Conclusiones	92
4.4	Materiales y métodos.....	93
4.4.1	Análisis del perfil metabólico de las actinobacterias.....	93
4.4.1.1	Preparación de la muestra y análisis de HPLC-MS.....	93
4.4.1.2	Análisis de los datos.....	94
5.	Tetrapéptidos cíclicos y dicetopiperazinas producidas por <i>Streptomyces</i> sp. PNM-161a con actividad contra bacterias y hongos fitopatógenos	98
5.1	Introducción	98
5.2	Resultados y Discusión	100
5.2.1	Compuesto 5.1.....	100
5.2.2	Compuesto 5.2.....	105
5.2.3	Compuestos 5.3 y 5.4.....	109
5.2.4	Compuestos 5.5 a 5.7	111
5.2.5	Resultados de actividad antimicrobiana.....	113
5.3	Conclusiones.....	115
5.4	Materiales y métodos.....	116
5.4.1	General.....	116
5.4.2	Fermentación de la cepa y extracción.....	116
5.4.3	Aislamiento de los compuestos.....	117
5.4.4	Determinación de la estereoquímica de los compuestos obtenidos por el método de Marfey.....	118
5.4.5	Ensayos de actividad antimicrobiana.....	119
6.	<i>Streptomyces</i> sp. PNM-208 como fuente de antimicinas con actividad antifúngica contra <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	121
6.1	Introducción.....	121
6.2	Resultados y discusión.....	121
6.2.1	Identificación de compuestos.....	123
6.2.1.1	Compuestos 6.1 a 6.3.....	123
6.2.2	Evaluación de la actividad antifúngica contra <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	134
6.3	Conclusiones.....	136
6.4	Materiales y métodos	136
6.4.1	General.....	136
6.4.2	Fermentación de la cepa y extracción.....	137

6.4.3 Aislamiento de los compuestos	137
6.4.4 Ensayos de actividad antimicrobiana	139
7. Feniletilamidas producidas por <i>Streptomyces</i> sp. PNM-9 y evaluación de su producción en diferentes medios de cultivo por técnicas metabolómicas	140
7.1 Introducción.....	140
7.2 Resultados y discusión.....	141
7.2.1 Evaluación de la producción de biomasa y la actividad de los extractos orgánicos 141	
7.2.2 Perfilado metabólico de <i>Streptomyces</i> sp. PNM-9 y correlación con su perfil de bioactividad.....	143
7.3 Conclusiones	153
7.4 Materiales y métodos	153
7.4.1 General.....	153
7.4.2 Medios de cultivo y condiciones.....	154
7.4.3 Estudio del cultivo en 15 días.....	155
7.4.4 Adquisición de los datos de RMN y análisis.....	155
7.4.5 Aislamiento de los compuestos bioactivos	156
8. Conclusiones y recomendaciones.....	159
9. Referencias	163

Lista de figuras

Figura 1.1 Representación esquemática de la esporulación en el ciclo de vida de una actinobacteria. Tomado de <i>Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria</i> . 2016 [11].	13
Figura 1.2 Producción de metabolitos secundarios en <i>Streptomyces</i> sp. (A) Corte vertical de una colonia de <i>Streptomyces</i> . (B) esquema que indica como la producción de antibióticos en la parte inferior de la colonia puede proteger los nutrientes liberados de las células muertas (blanco) soportando así el crecimiento aéreo y la esporulación [59]. (C) <i>Streptomyces</i> sp. PNM-148 y (D) <i>Streptomyces</i> sp. PNM-5 cepas aisladas como parte de nuestro trabajo.	14
Figura 1.3 Ejemplos de metabolitos bioactivos aislados de actinobacterias	18
Figura 1.4 Estructura de compuestos bioactivos de actinobacterias marinas	20
Figura 2.1 Morfología de las colonias en agar nutritivo, ISP-2, ISP-3 y agar ISP-4. Aislamiento PNM-25 (<i>Gordonia</i> sp.), aislamiento PNM-102N (<i>Micromonospora</i> sp.) y aislamiento PNM-182 (<i>Streptomyces</i> sp.)	31
Figura 2.2 Tinción de Gram de algunos de los aislamientos de actinobacterias obtenidos de ambientes marinos observados con el objetivo 100x A) PNM-161A, B) PNM-102N, C) PNM-5, D) PNM-9, E) PNM-208, F) PNM-89.3	32
Figura 2.3 Análisis por TLC de ácidos diaminopimélicos, quimio marcadores en <i>Actinobacteria</i> . Placas de Celulosa TLC Merck 20 x 20 cm. Fase móvil: Metanol / agua/ HCl 6N / piridina (80:26:4:10, v/v). Revelador: 0.2% de ninhidrina en acetona	33
Figura 2.4 Microscopia electrónica de barrido (SEM) de los aislamientos PNM-5(A), PNM-9 (B), PNM-161a (C), PNM-182 (D) y PNM-208 (E) cultivados en agar ISP-2 donde se observan las cadenas de esporas y su superficie.	37
Figura 2.5 Árbol filogenético basado en el gen 16S rRNA y sus vecinos.	40
Figura 2.6 Comparación de la reconstrucción filogenética basada en los genes 16SrRNA de las 24 <i>Actinobacterias</i> y los clusters generados por el perfil de MALDI-TOF.	43
Figura 3.1 Añublo bacteriano de la panícula de arroz (BPB) causado por bacterias del género <i>Burkholderia</i> sp [174]. La foto de la izquierda muestra una panícula baneada y a la derecha una panícula cargada con granos de arroz.	54
Figura 3.2 Marchitamiento vascular en cultivos de <i>Dianthus caryophyllus</i> L. causada por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> marchitamiento en raíz (izquierda), marchitamiento en la corona de la planta (derecha) [176].	55

Figura 3.3 Antracnosis causada por <i>Colletotrichum</i> sp. en ñame (A y B). Se observan manchas necróticas por antracnosis en hojas de ñame (C) y conidias del hongo <i>C. gloeosporioides</i> (D) [180].	56
Figura 3.4 Resultado de los ensayos de actividad por enfrentamiento directo y de los extractos de las 24 cepas de actinobacterias. (A, B) Enfrentamiento directo de las 24 actinobacterias Vs los 5 patógenos. En la parte superior se observan las fotografías A1: Control del crecimiento de las bacterias fitopatógenas. A2: Actividad antibacteriana de la bacteria <i>Streptomyces</i> sp. PNM-9. B1. Control del crecimiento del hongo <i>F. oxysporum</i> f. sp <i>dianthi</i> raza 2. B2. Actividad antifúngica de la bacteria <i>Streptomyces</i> sp. PNM-5. Actividad de los extractos orgánicos de las 24 cepas. El eje horizontal ilustra los códigos de las 24 Actinobacterias. En la figura el eje vertical muestra cada uno de los patógenos ensayados. La presencia de color en el cuadro indica un resultado positivo (control total o parcial del patógeno).	59
Figura 3.5 Resumen de los ensayos de actividad de los extractos acuosos de las 24 cepas de actinobacterias.	63
Figura 4.1 HCA (Hierarchical Clustering Analysis) basado en los perfiles metabólicos por LC-MS de los extractos orgánicos de 24 cepas de actinobacterias y el medio de cultivo TSB. Los números arábigos representan los códigos de las cepas. Los números romanos representan los cluster de acuerdo a la semejanza entre su perfil metabólico.	77
Figura 4.2 Barcoding vs Árbol filogenético. El eje horizontal muestra las variables con base en los valores de LC-MS ($Rt - m/z > 200$) de los 24 extractos. La presencia de una variable está representada por un cuadro negro. El eje vertical muestra cada una de las cepas de actinobacterias de acuerdo al árbol filogenético.	81
Figura 4.3 Algunos de los metabolitos tentativamente identificados mediante el proceso de derreplicación directa de los datos generados en el barcoding ($Rt-m/z$) obtenidos para la cepa <i>Streptomyces</i> sp. PNM-208 empleando la base de datos Antimarin 2013.	83
Figura 4.4 Análisis de Componentes Principales (PCA) de las 24 muestras (componentes 1 y 2).	84
Figura 4.5 Análisis de Componentes Principales (PCA) de 23 muestras (componentes 1 y 2) excluyendo la muestra PNM-208.	85
Figura 4.6 OPLS-DA- Actividad antibacteriana El <i>Score Scatter Plot</i> modelo A (izquierda) y el <i>Score Scatter Plot</i> modelo B (derecha) presentan la separación de los extractos orgánicos contra <i>Burkholderias</i> sp. en dos clases: en color verde los extractos activos y en color azul los extractos inactivos. En el modelo B se excluye del análisis la muestra PNM-208 (<i>outlier</i>).	87
Figura 4.7 OPLS-DA- Score Scatter Plot Actividad antifúngica.	88
Figura 5.1 Esquema de fraccionamiento del extracto orgánico obtenido de <i>Streptomyces</i> sp. PNM-161a.	99
Figura 5.2 Correlaciones clave de HMBC para el compuesto 5.1. En azul se presentan las correlaciones observadas en el experimento medido en DMSO- d_6 y en negro las observadas en el experimento medido en metanol- d_4 .	102

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

Figura 5.3 Cromatograma de los derivados en a y los patrones en b del compuesto 5.1.....	103
Figura 5.4 <i>ciclo</i> -[L-Pro-L-Phe-L-Pro-L-Leu] 5.1.....	104
Figura 5.5 Correlaciones clave de HMBC para el compuesto 5.2 En azul se presentan las correlaciones observadas en el experimento medido en DMSO- <i>d</i> ₆ y en negro las observadas en el experimento medido en metanol- <i>d</i> ₄	107
Figura 5.6 Cromatograma de los derivados en a y espectro UV del derivado de L-Pro en b del compuesto-5.2.	108
Figura 5.7 <i>ciclo</i> -[L-Pro-L-Phe-L-Pro-L-Ile] 5.2.....	109
Figura 5.8 <i>ciclo</i> -[L-Phe-D-Pro] 5.3 y <i>ciclo</i> -[L-Phe-L-Pro] 5.4	111
Figura 5.9 Estructuras de los compuestos 5.5 – 5.7	113
Figura 6.1 Esquema de fraccionamiento del extracto orgánico obtenido de <i>Streptomyces</i> sp. PNM-208	122
Figura 6.2 Estructura de los compuestos 6.1 a 6.3.....	127
Figura 6.3 Estructura de los compuestos 6.4 y 6.5	129
Figura 6.5 Estructura de los compuestos 6.6 y 6.7	134
Figura 6.6. Evaluación de la actividad antifúngica de los compuestos 6.1-6.7 expresada en porcentaje de germinación de las conidias del hongo fitopatógeno <i>C. gloeosporioides</i>	137
Figura 7.1 Actividad antibacteriana de los extractos orgánicos de <i>Streptomyces</i> sp. PNM-9. A. Cinética de actividad antibacteriana de los extractos de PNM-9 (250 µg/mL) en cuatro medios líquidos. B Correlación de la producción de biomasa (lineas) con la actividad antibacteriana en cada uno de los cuator medios (barras), teniendo como control negativo una solución de metanol en agua 10% (MTH) y como control positivo gentamicina 20.µg/mL. La figura presenta el promedio ± la desviación estándar de las tres replicas independientes.....	142
Figura 7.2 Análisis de Componentes Principales (PCA) de las muestras con los controles de calidad, en rojo se ve el clúster generado por estas muestras.....	144
Figura 7.3 Análisis multivariado de la actividad antibacteriana contra <i>B. glumae</i>	146
Figura 7.4 Comparación de los perfiles en los días 1, 2, 5, 10 y 15. Con las flechas se muestran las señales que corresponden a las VIPs encontradas en el análisis multivariado y su producción selectiva en los días 2, 5 y 15.....	150

Lista de tablas

Tabla 2.1 Test bioquímico para 24 cepas marinas. API 20E Test (bioMérieux Inc., Durham, NC) – Oxidasa - Catalasa – L,L DAP (<i>Streptomyces</i>)	35
Tabla 2.2 Afiliación de cepas de <i>Actinobacterias</i> aisladas de muestras marina	39
Tabla 4.1 Priorización de cepas para futuros estudios químicos.....	91
Tabla 5.1 Datos de RMN 1D de 5.1 en metanol- d_4 (RMN- ^1H a 400 MHz; RMN- ^{13}C a 100 MHz)	101
Tabla 5.3 Datos de RMN 1D de 5.3 y 5.4 en cloroformo- d_1 (RMN- ^1H a 400 MHz; RMN- ^{13}C a 100 MHz)	109
Tabla 5.4 Concentración mínima inhibitoria (MIC) de los compuestos 5.1 – 5.7.	114
Tabla 6.1 Datos de RMN- ^1H de 6.1, 6.2 y 6.3 en cloroformo- d_1 (RMN- ^1H a 600 MHz)	125
Tabla 6.2 Tabla Datos de RMN- ^{13}C de 6.1, 6.2 y 6.3 en cloroformo- d_1 (RMN- ^1H a 150 MHz)	126
Tabla 6.3 Datos de RMN- ^1H de 6.4 y 6.5 en cloroformo- d_1 (RMN- ^1H a 600 MHz)	130
Tabla 6.4 Datos de RMN ^{13}C de 6.4 y 6.5 en cloroformo- d_1 (RMN- ^{13}C a 150 MHz)	132

Lista de abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
AAs	Agar avena suplementado con sales
AcOEt	Acetato de etilo
ACN	Acetonitrilo
ANLA	Autoridad Nacional de Licencias Ambientales
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BPB	Añublo bacteriano de la panícula de arroz
<i>bs</i>	Singlete ancho
CC	Cromatografía en columna
<i>COSY</i>	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CDCl ₃	Cloroformo- <i>d</i> ₁
CD ₃ OD	Metanol- <i>d</i> ₄
CSA	<i>Casein-starch agar</i>
<i>d</i>	Doblete
DAD	<i>Diode Arrangement Detector</i>
<i>dd</i>	Doble doblete
DMSO	Dimetilsulfóxido
DKPs	Dicetopiperazinas
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
ELSD	<i>Evaporative light scattering detector</i>
HCA	Análisis jerárquico de cluster
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Correlation through multiple bond coherence</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
<i>Hz</i>	<i>Hertz</i>
IQS	Inhibidores de <i>quorum sensing</i>

ISP	<i>International Streptomyces Project</i>
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
KB	<i>King's B</i>
LB	Luria-Bertani
LBm	Luria-Bertani mínimo
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
LL-DAP	Ácido L,L-diaminopimélico
<i>m</i>	Multiplete
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization -Time-Of-Flight</i>
MeOH	Metanol
MeOD	Metanol- <i>d</i> ₄
MH	Mueller-Hinton
MIC	Concentración mínima inhibitoria
MS	<i>Mass spectrometry</i>
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i>
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
ND	No detectado
NOESY	<i>Nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
OD	Densidad óptica
OTU	Unidades Taxonómicas Operacionales
OPLS	Proyección ortogonal de estructuras latentes
PCA	Análisis de componentes principales
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
ppm	Partes por millón
<i>q</i>	Cuarteto
QC	Control de calidad
RMN	Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear
<i>Rt</i>	<i>Retention time</i>
<i>s</i>	Singlete
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
<i>t</i>	Triplete
TLC	<i>Thin layer chromatography</i>
TSA	<i>Trypticase soy agar</i>
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i>
TSBm	Tripticasa soya mínimo

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

UHPLC	<i>Ultra High Pressure Liquid Chromatography</i>
UV	Ultravioleta
UV	<i>Unit variance scaling</i>
VIPs	Variables importantes de la proyección
δ	Desplazamiento químico

Introducción

Colombia al ser un país tropical, se caracteriza por presentar zonas con suelos muy productivos que permiten el establecimiento de diversos tipos de cultivos [1]. Sin embargo, una de las problemáticas que enfrenta el sector agrícola nacional, es la alta incidencia de enfermedades de diferente origen etiológico que afectan el desarrollo de las plantas generando pérdidas significativas en la producción [2]. La presencia de fitopatógenos en cultivos de importancia económica mundial y los problemas que de allí se derivan, han llevado tanto a la industria como a la academia a incrementar sus esfuerzos en la búsqueda de soluciones a esta problemática [3].

Las actuales técnicas de control de las enfermedades causadas por los fitopatógenos, se basan principalmente en el control químico con el uso de plaguicidas sintéticos. Entre ellos se encuentran fungicidas, bactericidas e insecticidas, los cuales presentan desventajas como su alta toxicidad y baja selectividad; además, estos compuestos pueden permanecer en el sitio de aplicación durante largos periodos de tiempo afectando a todos los organismos en contacto directo con el cultivo, incluyendo a microorganismos benéficos e incluso a humanos [4], [5].

La búsqueda de microorganismos como agentes controladores de fitopatógenos por lo general ha sido realizada a partir de muestras de suelo, permitiendo el desarrollo de varios productos comerciales que al día de hoy se muestran como una alternativa interesante para la sustitución, al menos en parte, de plaguicidas de origen sintético. Sin embargo, la continua exploración de este nicho ecológico ha llevado al aislamiento redundante de microorganismos que a su vez ha generado el re-aislamiento de moléculas ya reportadas [6], lo cual pone de manifiesto la importancia de explorar nuevas fuentes de microorganismos y de compuestos para este tipo de aplicaciones.

Dentro de estos nuevos ambientes, el océano es reconocido como un ecosistema que posee gran diversidad de microorganismos y cuya composición y distribución es aún poco conocida, por lo que se considera importante emprender la búsqueda de microorganismos en nuevos nichos como el mar [7]. La mayoría de investigaciones sobre la producción de compuestos bioactivos a partir de microorganismos marinos se han desarrollado con el objetivo de identificar nuevos metabolitos y enzimas para aplicaciones farmacológicas, cosméticas e industriales. Sin embargo, la búsqueda de aplicaciones agrícolas ha permitido reconocer a los microorganismos marinos como una fuente importante de metabolitos secundarios con el potencial de ser utilizados para el control de fitopatógenos [8], [9]. Particularmente, las cepas de actinobacterias y firmicutes tienen la habilidad de sintetizar compuestos que han mostrado ser útiles como antibacterianos, antifúngicos, insecticidas y compuestos que promueven el crecimiento de las plantas, lo cual muestra su potencial para el desarrollo de productos de base biotecnológica para el apoyo del sector agrícola [10], [11]

De otro lado, la bioprospección de cepas microbianas para tratar de aislar nuevos compuestos bioactivos ha dado un giro reciente hacia la implementación de estrategias integradas, que combinan datos filogenéticos y pruebas de bioactividad, con datos del perfilado metabólico y estrategias de derreplicación de las cepas bacterianas, como una alternativa rápida para identificar en mezcla metabolitos bioactivos ya conocidos [12], [13]. Estos nuevos enfoques, junto con la aplicación de métodos de análisis multivariado (PCA, HCA, OPLS y otros), han demostrado ser eficaces para lograr la rápida identificación de compuestos, lo cual, junto con los datos de la actividad biológica de los extractos, es utilizado como herramienta para seleccionar aquellos microorganismos con los cuales continuar los estudios que permitan el aislamiento y la elucidación de los compuestos responsables de la actividad biológica [14], [15].

En Colombia, el estudio de microorganismos marinos como fuente de compuestos bioactivos, se encuentra en sus etapas iniciales, por lo que su potencial, aunque resulta desconocido, también resulta altamente promisorio. Sabemos que nuestro país cuenta con una diversidad marina inmensa que solo ha sido estudiada parcialmente a través de esfuerzos particulares de investigadores colombianos y extranjeros, pero no de manera sistemática. Uno de los puntos que ha limitado el avance de los productos naturales marinos como fuente de compuestos de

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

interés biotecnológico, es la poca cantidad en la que se aíslan dichos compuestos, comúnmente llamado el problema del suministro. Por tanto, enfocándonos en encontrar además de los compuestos activos, una solución al problema del suministro de estas moléculas de interés se ha establecido en el grupo de investigación “Estudio y aprovechamiento de productos naturales marinos y frutas de Colombia” la línea de microbiología marina, donde se ha desarrollado el presente trabajo que pretende evaluar el uso de actinobacterias aisladas de ambientes marinos como fuente de compuestos para el control de fitopatógenos.

El presente trabajo planteó como objetivo general: Contribuir al estudio de actinobacterias aisladas y caracterizadas del mar Caribe Colombiano como fuente de compuestos activos que les permitan actuar como potenciales agentes de control biológico de fitopatógenos. Para cumplir con esto se planteó como objetivos específicos: 1- Aislar y conservar cepas de actinobacterias obtenidas de muestras de ambientes marinos (p. ej. sedimentos, invertebrados, octocorales, entre otros) recolectadas en el Caribe Colombiano. 2- Basados en criterios de actividad como biocontroladores de fitopatógenos (por ejemplo, actividad antibacteriana, antifúngica y citotóxica para evaluar su toxicidad), seleccionar entre 2 y 5 de las cepas activas como posibles fuentes de compuestos biológicamente activos. 3- A partir de los extractos de las cepas seleccionadas en el objetivo anterior, aislar por métodos cromatográficos e identificar por métodos espectroscópicos y químicos los compuestos responsables de la actividad biológica.

Los resultados de la obtención e identificación de la colección de actinobacterias, así como la evaluación de la actividad para el control de fitopatógenos se presentan en los capítulos 2 y 3, respectivamente. La implementación de herramientas metabólicas, así como la propuesta de una estrategia que integró la información taxonómica, de bioactividad y del perfilado metabólico de los extractos de estas cepas de actinobacterias, se presenta en el capítulo 4. Con esta información, se abordó el estudio químico de tres cepas de la colección que permitió el aislamiento de 16 compuestos y la evaluación de su actividad contra fitopatógenos, lo cual se presenta en los capítulos 5 a 7, cumpliendo así con los objetivos propuestos para este trabajo doctoral.

1. Actinobacterias marinas y su potencial aplicación en la agricultura

1.1 El impacto de los fitopatógenos en la agricultura

Las plantas constantemente son atacadas por una gran variedad de patógenos incluyendo bacterias, hongos y virus. De acuerdo con su forma de nutrirse, los patógenos de las plantas se pueden dividir en dos categorías principales: biotróficos y necrotróficos. La mayoría de las bacterias y los virus se consideran biotróficos, mientras que los hongos por lo general, adoptan un estilo de vida necrotrófico [16]. Los microorganismos fitopatógenos, ya sean bacterias, hongos o virus, son los mayores responsables de causar enfermedades en los cultivos de importancia económica mundial, generando la pérdida de alrededor del 25% de los cultivos.

Por una parte, las bacterias fitopatógenas representan una gran amenaza para la planta huésped, debido a la dificultad que tienen las plantas para generar mecanismos de resistencia o inmunidad efectivos contra estos microorganismos, a la falta de métodos adecuados para su control y a su propagación inadvertida [17]. Las bacterias fitopatógenas pueden afectar en cualquier tipo de clima, teniendo una menor prevalencia en lugares áridos, dada la importancia que tiene la humedad en la diseminación de las bacterias y en el desarrollo de la enfermedad.

Las infecciones generadas por bacterias fitopatógenas presentan varios síntomas, entre ellos están la clorosis, necrosis, podredumbre negra de la raíz, agrietamiento de las hojas, tumores, marchitamiento, entre otros [18]. Para generar estos síntomas la bacteria debe enfrentarse a los diferentes mecanismos de defensa que posee la planta, adquirir agua y los nutrientes necesarios para lograr su crecimiento y colonización de los tejidos vegetales. Es por esto que las bacterias fitopatógenas, producen una gran variedad de factores de virulencia como enzimas degradadoras de la pared celular, toxinas y hormonas [19].

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

Hoy en día, se sabe que al menos 350 bacterias son patógenas de las plantas y en su mayoría pertenecen al Phylum *Proteobacteria* [20]. Dentro de las bacterias fitopatógenas que presentan mayor impacto a nivel mundial debido a las pérdidas económicas que generan, se encuentra en primer lugar *Pseudomonas syringae* causante de enfermedades en diversos cultivos entre ellos el tomate; en segundo lugar, figura *Ralstonia solanacearum* patógeno de los cultivos de papa, tomate, tabaco, plantas ornamentales y banano entre otros. En esta lista también figura la bacteria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, que afecta cultivos de arroz causando el tizón de la hoja de arroz y por la cual se reportan pérdidas entre el 10-50% [21].

Por otra parte, los hongos fitopatógenos también representan una amenaza para la industria agrícola, debido al alto costo que representa su control [22]. Los hongos ingresan a la planta por medio de aperturas naturales como las estomas o penetrando directamente en la célula vegetal. Sus estrategias de infección dependen principalmente del sitio de desarrollo de la planta y la pared celular se constituye en el mayor obstáculo para el fitopatógeno, debido a las barreras físicas y químicas que esta posee (proteínas y metabolitos antimicrobianos) [23].

Dentro de las enfermedades causadas por los hongos fitopatógenos están las conocidas como moho, tizón tardío, oídio, canchales, marchitamiento vascular y pudrición de la raíz. Una lista con los hongos fitopatógenos más importantes a nivel económico incluye a *Magnaporthe oryzae* causante del tizón del arroz [24]. Los expertos destacan la importancia económica de esta especie, ya que puede afectar de manera devastadora a los arrozales (base alimenticia de la mitad de la población mundial).

Otro de los hongos con alto impacto en diferentes áreas a nivel mundial es *Botrytis cinerea* por ser un patógeno de amplio espectro causante del moho gris o podredumbre gris. Además de estos dos fitopatógenos, se conoce el alto impacto de hongos del género *Puccinia* spp., afectando principalmente a los cultivos de trigo, *Fusarium graminearum* que afecta plantaciones de cereales, *Fusarium oxysporum* que afecta a cultivos tan diversos como tomate, algodón, banano, flores, así como las especies de *Colletotrichum* spp. que afectan especialmente a cultivos de frutas y plantas ornamentales [24]. Como una aproximación que ilustra el impacto económico de estos fitopatógenos en la agricultura, se estima que para el control químico del

hongo *Botrytis* se gastan aproximadamente €40 por hectárea y se estima que los costos llegan a €540 millones anuales en compuestos específicamente dirigidos al control de *Botrytis* también llamados “botrycidas”, los cuales representan el 10% del mercado global de fungicidas. Es por esto que el control de estas infecciones, tiene un impacto significativo sobre el rendimiento en la producción de alimentos, el uso de superficies agrícolas y el agua a nivel mundial [25].

1.2 Estrategias para el control de fitopatógenos

Las actuales técnicas de control de las enfermedades causadas por los fitopatógenos, se basan principalmente en el control químico con el uso de plaguicidas sintéticos. Entre ellos se encuentran fungicidas, bactericidas e insecticidas, los cuales presentan a pesar de mostrar efectividad al momento de controlar diferentes plagas, también presentan desventajas. Estos compuestos son altamente tóxicos y poco selectivos en su diana biológica. Además, pueden permanecer en sitio de aplicación durante largos periodos de tiempo afectando a varias generaciones de organismos y además pueden contaminar fuentes hídricas, lo cual aumenta su área de impacto [4]. Los efectos tóxicos afectan a todos los organismos en contacto directo con el cultivo, incluyendo a microorganismos benéficos y a humanos (afectando órganos y/o procesos biológicos) [26].

Por lo anterior, los plaguicidas representan un problema importante de salud debido entre otras causas a las prácticas laborales inadecuadas, dado que los agricultores se exponen a los plaguicidas durante la aplicación y las operaciones de manipulación, tales como el mezclado, la limpieza y el equipamiento de carga [27]. Adicionalmente, estos compuestos han perdido eficacia para el control de algunas enfermedades debido al surgimiento de resistencia por parte de las cepas patógenas, lo cual puede ser causado por la misma persistencia de estos pesticidas en el ambiente [28], [29].

Una segunda estrategia de manejo son los cultivos transgénicos, cultivos genéticamente modificados resistentes a la enfermedad. Aunque las grandes compañías promotoras de estas tecnologías argumentan que la introducción planificada de cultivos transgénicos puede reducir o hasta eliminar las enormes pérdidas que ocasionan las plagas y los patógenos, y que el uso de estos cultivos provee efectos benéficos al ambiente al reducir significativamente el

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

uso de agroquímicos, es una de las opciones que presenta mayor escepticismo y preocupación por parte de los consumidores en lo referente a la seguridad de su consumo [30].

Ambientalistas y científicos han expresado su preocupación por los riesgos que podrían derivarse de los organismos genéticamente modificados. Se ha afirmado que estos productos biotecnológicos sólo reforzarán la dependencia en los pesticidas, puesto que los cultivos transgénicos alteran la biota del suelo, afectando procesos tales como la descomposición de la materia orgánica y la mineralización. Adicionalmente, si los lixiviados de un cultivo inhiben la actividad de la biota del suelo o disminuyen la tasa natural de descomposición y liberación de nutrientes, la fertilidad del suelo se puede reducir dramáticamente. Lo anterior conllevaría al uso de fertilizantes costosos, a los cuales no podrían acceder la mayoría de los agricultores [31], [32].

La tercera estrategia involucra el uso de microorganismos benéficos, que puedan actuar como agentes de control de fitopatógenos específicos. Esto permitiría la reducción en los riesgos de resistencia de los fitopatógenos debido a la selectividad en el modo de acción del agente de control sobre el patógeno [33], [34], disminuyendo así los efectos ambientales y riesgos a la salud pública [35].

Las bacterias que actúan como agentes controladores permiten una disminución de la población de los fitopatógenos, reduciendo el daño y la pérdida de los cultivos [17], [36]. Actúan por medio de mecanismos basados en el fortalecimiento de la planta, facilitando la absorción de nutrientes o por medio de la protección contra enfermedades producidas por los agentes fitopatógenos. La antibiosis y la inhibición de la comunicación celular son algunos de los mecanismos que usan los agentes biocontroladores para inhibir el crecimiento del fitopatógeno, los cuales se basan en la producción de metabolitos secundarios. Estos metabolitos biológicamente activos pueden interferir con el mecanismo de crecimiento de los fitopatógenos o pueden inhibir la comunicación celular (*quorum quenching*) del fitopatógeno evitando la expresión de factores de virulencia controlados por *quorum sensing* [37].

Si bien, la mayoría de investigaciones sobre la producción de compuestos bioactivos a partir de microorganismos se han desarrollado con el objetivo de aislar, purificar e identificar nuevos metabolitos para aplicaciones farmacológicas, cosméticas e industriales, las aplicaciones en campos como la agricultura han sido menos abordadas [38], [39]. A nivel agroindustrial, las bacterias que han sido más estudiadas como agentes biocontroladores pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Bacillus*. También se han considerado como potenciales biocontroladores, bacterias de los géneros *Acinetobacter*, *Burkholderia* y *Paenibacillus*. Diferentes especies del género *Bacillus* spp. han permitido el desarrollo de formulaciones que se encuentran actualmente en el mercado [39].

La búsqueda de microorganismos como agentes biocontroladores por lo general ha sido realizada por medio del aislamiento de muestras de suelo. Esta tendencia ha derivado en el aislamiento redundante de microorganismos y en el aislamiento e identificación de antibióticos previamente reportados [6]. Con este panorama se hace evidente la importancia de explorar fuentes novedosas para el aislamiento de microorganismos y moléculas. El océano, representa uno de los ecosistemas con una alta diversidad en términos de macro y microorganismos cuya distribución es poco conocida, haciéndolo una fuente promisoría para su exploración en términos de la potencial diversidad química que pueden tener los microorganismos provenientes de estos nichos [7].

1.3 Microorganismos marinos como fuente de compuestos

Algunas de las diferencias existentes entre los microorganismos aislados de hábitats terrestres y acuáticos, se reflejan en su diversidad genética y metabólica, lo cual ha reorientado la búsqueda de microorganismos con potencial biotecnológico hacia ambientes poco estudiados como sedimentos de ríos, lagos y océanos. Estos ambientes ofrecen la posibilidad de encontrar cepas nativas, desconocidas, o que se encuentran en condiciones ambientales tan particulares que les permite producir metabolitos activos y novedosos [40].

Aunque la diversidad de organismos en el medio terrestre es grande, se sabe que es mucho mayor en los océanos, ya que más del 70% de la superficie de nuestro planeta está cubierta por agua. Los expertos estiman que se puede encontrar una mayor diversidad biológica en ecosistemas como las profundidades del mar y los arrecifes de coral, que en los bosques

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

lluviosos tropicales [41]. A los microorganismos marinos se les puede encontrar en forma libre, en organizaciones simbióticas con invertebrados, desarrollando adaptaciones especializadas, estables y específicas al microambiente creado por el organismo hospedero [42]. Sin embargo, a pesar de que los océanos contienen una gran diversidad de microorganismos, en el mejor de los casos sólo se ha logrado identificar cerca del 0,1 % de las especies presentes. La comunidad científica ahora es consciente de que sólo una pequeña fracción de la diversidad microbiana ha sido sistemáticamente muestreada [43].

Los compuestos aislados de microorganismos marinos poseen estructuras químicas novedosas, las cuales se han convertido en prototipos para el desarrollo de compuestos con aplicaciones en la industria farmacéutica y en la agricultura [42]. Un ejemplo de ello se refleja en el estudio de la ascidia *Ecteinascidia turbinata*, cuyo extracto hidroetanólico mostró actividad antineoplásica en estudios realizados en 1969. Algunos años después se publicaron de forma independiente las estructuras de las ecteinascidinas, las cuales permitieron el desarrollo del fármaco anticancer Yondelis® (trabectedina). De igual manera se ha establecido que el verdadero productor de las ecteinascidinas es un endosimbionte identificado como γ -proteobacteria *Candidatus Endoecteinascidia frumentensis* [9]. Otro caso similar se presenta con la briostatina-1, un macrólido con actividad anticáncer originalmente aislado del briozoo *Bugula neritina*. Posteriormente se encontró que el macrólido es producido por un simbiote identificado preliminarmente como *Candidatus Endobugula serluta* [44], [45].

Entre 1997 y el 2008 se habían reportado más de 660 nuevos compuestos provenientes de bacterias aisladas de ambientes marinos con diferentes actividades biológicas (antimicrobianos, antihelmínticos, antiparasitarios, inmuno-moduladores, anti cancerígenos); la mayoría de estos compuestos provenían de bacterias de las clases *Actinobacteria* y *Cyanobacteria* y en menor grado de *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroides* [9]. Para el año 2015 se habían reportado 164 compuestos nuevos aislados de bacterias marinas, número similar a los 158 compuestos reportados en el año 2013 [9]. En este sentido, los productos naturales marinos y dentro de ellos, los obtenidos de microorganismos aislados de ambientes marinos juegan un papel importante en el descubrimiento de metabolitos secundarios

bioactivos, los cuales incluyen dianas enzimáticas que permiten preveer su aplicabilidad como agentes agroquímicos.

Algunos de los compuestos de origen marino presentan potentes actividades insecticidas, antibacterianas y antifúngicas. Compuestos producidos por microorganismos como la kasugamicina [46], polioxinas [47], validamicina [48], oxitetraciclina [49] y estreptomycinina [50], las cuales serán presentadas más adelante en este capítulo, son actualmente empleados como fungicidas y bactericidas.

Se espera que en los próximos quince años (2016-2030), los compuestos derivados de los microorganismos especialmente de las actinobacterias seguramente dominen el campo de los productos naturales marinos. Esto se debe a factores tales como el interés por la diversidad de los metabolitos producidos por aislamientos marinos de estos microorganismos y a su relativa facilidad de recuperación a partir de muestras de sedimentos, lodos o como simbioses de invertebrados [9].

Otro factor influyente, es el continuo desarrollo de tecnologías para la exploración de su potencial genético. Se ha propuesto que muchos de los genes que podrían estar involucrados en la síntesis de un mayor número de metabolitos secundarios a los conocidos actualmente, aún permanecen silenciados. Lo anterior deriva en grandes esfuerzos no solo para incrementar el número de aislamientos, sino también para estudiar los mecanismos de activación de nuevas rutas biosintéticas en estos aislamientos marinos [51]-[54].

1.3.1. Phylum Actinobacteria

La primera clasificación formal se dio en el año 1943 por Waksman y Henrici, al considerar dichos microorganismos como un puente evolutivo entre bacterias y hongos. Así transcurrieron varias décadas considerando a este grupo microscópico como parte del reino Fungi, debido a su similitud morfológica. Su nombre proviene del griego *actis*: rayo de sol y *mykes*: hongo, por lo que dada su forma era fácil denominarlos como “hongos radiados” [55].

En 1997 se propone la clase *Actinobacteria*, compuesta por el orden *Actinomycetales* y sus parientes filogenéticos con un alto contenido en G+C [56]. La clase *Actinobacteria* constituye uno de los principales *phyla* dentro del dominio Bacteria. Esta primera clasificación adoptó 95 géneros, pertenecientes a 30 familias y 10 subórdenes.

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

La segunda edición del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology recoge esa clasificación, en la que la clase *Actinobacteria* se eleva al rango de *Phylum*. En el año 2006, Dworkin y sus colaboradores adoptaron una nueva clasificación donde se incluían 6 órdenes, 39 familias y más de 130 géneros. Actualmente, el *phylum Actinobacteria* cuenta con más de 215 géneros, 5 subclases, 6 órdenes y 14 subórdenes siendo uno de los más importantes el orden *Actinomycetales*, grupo conocido como *Actinobacteria* [56].

Las actinobacterias forman un grupo de microorganismos morfológicamente muy heterogéneo. Muchos de ellos forman filamentos ramificados o hifas y esporas asexuales. Se pueden encontrar organismos que forman micelio ramificado y bien diferenciado como es el caso del género *Streptomyces*, otros que poseen hifas que se pueden fragmentar, como es el caso del género *Nocardia*; además varios géneros como *Gordonia* y *Mycobacterium* que poseen formas cocobacilares [57].

Dos de las propiedades más significativas de las actinobacterias son sus habilidades para sintetizar compuestos antimicrobianos y para desarrollarse sobre sustratos muy diversos que no pueden ser usados por otros microorganismos, como la quitina y la celulosa. Estas propiedades ponen de manifiesto la riqueza del metabolismo celular de este grupo microbiano [58].

En la Figura 1.1 se puede observar que durante el ciclo de vida de las actinobacterias se presenta como una primera etapa del proceso de diferenciación celular, seguida de la germinación de esporas cuando éstas encuentran las condiciones adecuadas, generándose el micelio del sustrato. Posteriormente, comienza el crecimiento de la colonia y se desarrolla una estructura micelial idéntica en la parte superior, denominada micelio aéreo. Cuando escasean los nutrientes, como una condición de estrés, las hifas se fragmentan hasta que se da origen a nuevas esporas [11].

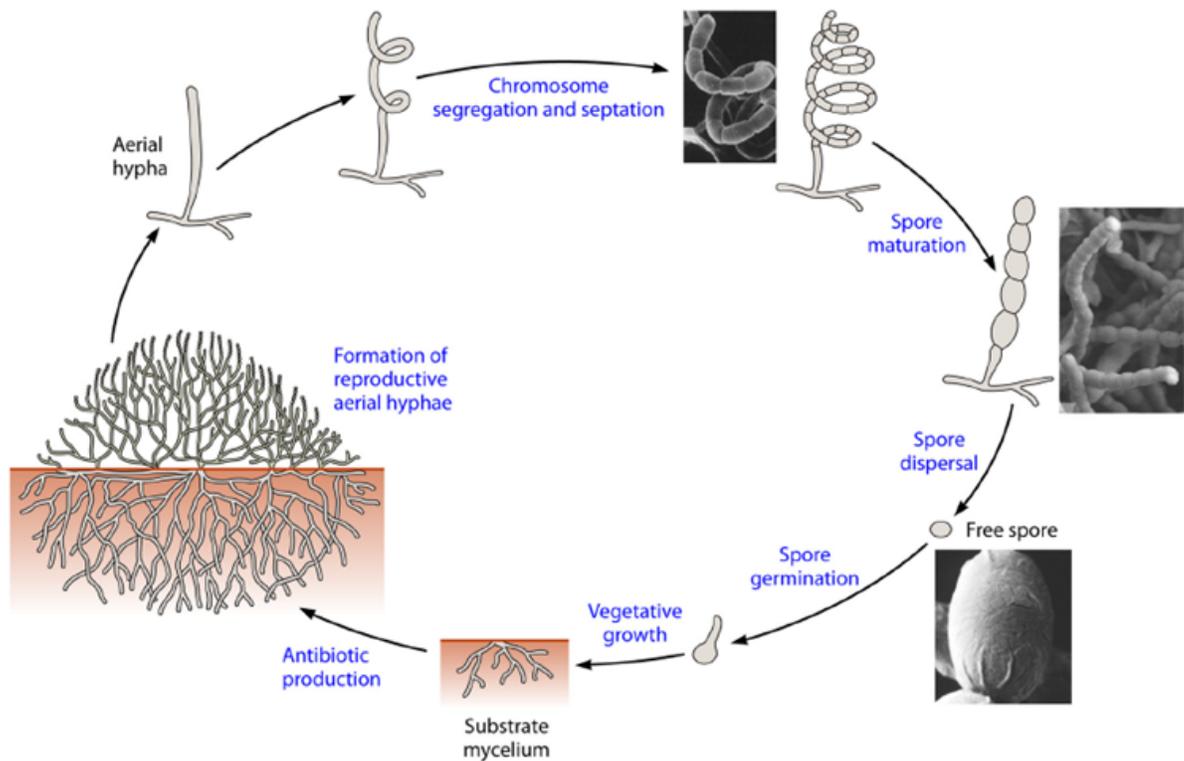


Figura 1.1 Representación esquemática de la esporulación en el ciclo de vida de una actinobacteria. Tomado de *Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria*. 2016 [11].

A la par que ocurre este proceso, se presenta la producción de metabolitos secundarios que son el objeto de estudio en el presente trabajo. En la parte superior izquierda de la Figura 1.2, se observa un corte vertical de una colonia de *Streptomyces* sp. y en la parte superior derecha se presenta un diagrama el cual indica cómo la producción de antibióticos en la parte inferior de la colonia puede proteger los nutrientes liberados de las células muertas (blancas) para que puedan apoyar el crecimiento del micelio aéreo y la esporulación. Las células vivas se representan en color negro [59]. Un ejemplo de esto, también lo podemos observar en la parte inferior de la Figura 1.2 en las fotografías tomadas a dos de nuestros aislamientos (*Streptomyces* sp. PNM-5 y *Streptomyces* sp. PNM-148), donde se evidencia la producción de compuestos por parte de la colonia.

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

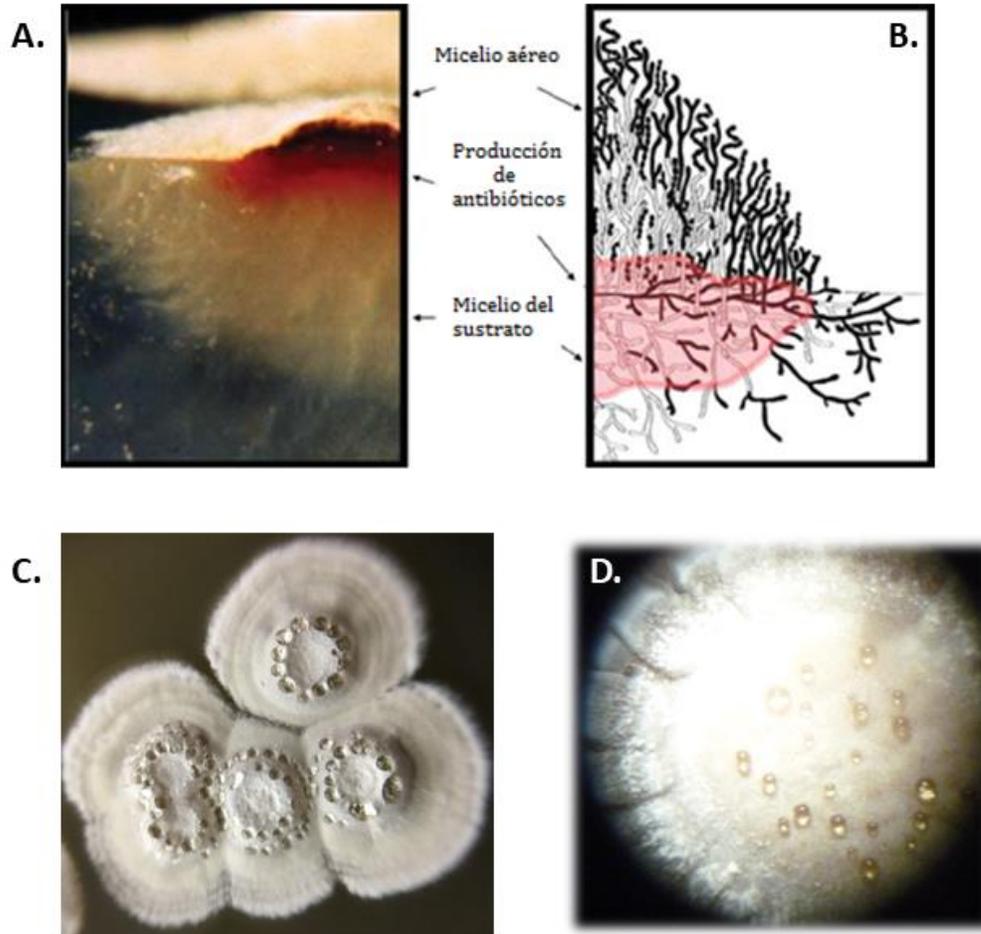


Figura 1.2 Producción de metabolitos secundarios en *Streptomyces* sp. (A) Corte vertical de una colonia de *Streptomyces*. (B) esquema que indica como la producción de antibióticos en la parte inferior de la colonia puede proteger los nutrientes liberados de las células muertas (blanco) soportando así el crecimiento aéreo y la esporulación [59]. (C) *Streptomyces* sp. PNM-148 y (D) *Streptomyces* sp. PNM-5 cepas aisladas como parte de nuestro trabajo.

Las actinobacterias pueden utilizar como fuente de carbono compuestos simples y complejos tales como ácidos orgánicos, azúcares, polisacáridos, lípidos, proteínas e hidrocarburos alifáticos. Muchos de estos microorganismos pueden degradar proteínas, lípidos, almidón y quitina. Dado su producción de compuestos prolífica, se han diseñado numerosas estrategias para el aislamiento de estas bacterias y con los avances tecnológicos poco a poco se ha ido

superando la falta de accesibilidad a hábitats poco comunes como los ecosistemas acuáticos [60].

Particularmente, las cepas de actinobacterias tienen la habilidad de sintetizar compuestos que han mostrado ser útiles como antibacterianos, antifúngicos, insecticidas, antitumorales, antiinflamatorios, antiparasitarios, antifouling, antiinfecciosos y compuestos que promueven el crecimiento de las plantas, entre otros. También sintetizan compuestos inhibidores de enzimas y vitaminas por lo cual son importantes microorganismos reconocidos por su potencial para el desarrollo de productos de base biotecnológica [10], [61], [62].

1.3.2 Actinobacterias aisladas de ambientes marinos

Los microorganismos marinos en general y entre ellos las actinobacterias, han tenido que adaptarse durante la evolución, a condiciones de vida que varían desde presiones extremadamente altas (hasta 1100 atmósferas) y condiciones anaeróbicas a temperaturas por debajo de 0°C en el fondo del mar, hasta condiciones altamente ácidas (con pH 2.8) con temperaturas superiores a 100°C cerca a respiraderos hidrotermales en el océano. Es probable que esto se vea reflejado en la diversidad genética y metabólica de las actinobacterias aisladas de ambientes marinos, la cual aún sigue siendo en gran medida desconocida. En efecto, a pesar de los esfuerzos realizados a nivel mundial, el medio marino se considera una fuente muy poco explorada de la diversidad de las actinobacterias [63].

Las primeras evidencias que apoyan la existencia de actinobacterias marinas se obtuvieron con la descripción de *Rhodococcus marinonascens*, (primera especie de actinobacteria marina en ser caracterizada) [64]. En el pasado, hallazgos sobre las adaptaciones marinas específicas en algunas cepas y la actividad metabólica en cepas de sedimentos marinos, no fueron lo suficientemente fuertes para estimular la búsqueda de actinobacterias en el medio marino [65]. Sin embargo, datos obtenidos a partir de técnicas dependientes del cultivo, han demostrado que las actinobacterias marinas autóctonas efectivamente sí existen. Estos incluyen a miembros de los géneros *Dietzia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Salinispora*, *Marinophilus*, *Solwaraspora*, *Salinibacterium*, *Aeromicrobium*, *Williamsia* y *Verrucosipora* [66], [67]. Entre éstos, uno de los hallazgos más interesantes fue el descubrimiento de la primera actinobacteria marina obligada del género *Salinispora* (anteriormente conocido como *Salinospora*) y la descripción formal de tres de sus especies *Salinispora tropica*, *S. arenicola* y *S.*

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

pacífica, demostrando la presencia de extensas poblaciones de este género en los sedimentos oceánicos [68].

Dado que las actinobacterias en el océano experimentan un conjunto de condiciones ambientales muy diferentes a las de sus contrapartes terrestres, es importante emprender estudios sobre la producción metabólica de cepas aisladas de estos ambientes, pues su diversidad aún no se ha explorado totalmente y las adaptaciones de estos microorganismos al medio marino, podrían derivar en la producción de metabolitos secundarios aún desconocidos y potencialmente aprovechables [69]. También se ha reportado que las actinobacterias pueden colonizar los agregados orgánicos marinos y con su actividad antagonista, podrían jugar un papel muy importante en el proceso de degradación y mineralización de la materia orgánica, considerandolas así como componentes activos de las comunidades microbianas marinas capaces de formar poblaciones permanentes y estables en diversos ecosistemas marinos [70].

Los reportes geográficos indican que aproximadamente el 67% de los estudios realizados sobre actinobacterias marinas productoras de compuestos bioactivos, proceden de Australia, el Caribe, el Océano Índico, Japón, el Mediterráneo, y algunos pocos sitios del Océano Pacífico Occidental [63].

1.3.3 Actinobacterias marinas como fuente de compuestos bioactivos

Algunos reportes de la literatura indican que el 45% de los metabolitos microbianos obtenidos de ambientes marinos han sido aislados de actinobacterias [71]. De estos compuestos, el 75% fueron obtenidos de especies del género *Streptomyces* y el 25% son producidos por especies de “*Actinobacterias raras*” como comúnmente se le conoce a los géneros diferentes a *Streptomyces*. De las actinobacterias aisladas de ambientes marinos se han aislado y caracterizado diversos tipos de compuestos entre los cuales se pueden citar: isoprenoides, policétidos, péptidos, aminoglucósidos, polienos, macrólidos, glicopéptidos, nucleósidos, poliésteres y tetraciclinas entre otros [38].

Las estructuras únicas de los cientos de policétidos y péptidos que se han logrado identificar surgen a través de la acción de múltiples enzimas organizadas en sistemas que se asemejan a líneas de ensamblaje. La identidad y el orden de cada dominio de la proteína en una cadena de ensamblaje específica puede depender de: (i) la secuencia de unidades del monómero activado que se incorpora, (ii) las reacciones químicas que se producen en cada estación de la línea de ensamblaje y (iii) la longitud y la funcionalidad del producto final en la línea de ensamblaje [72]. La producción de estos metabolitos en el laboratorio se ve afectada por diversos parámetros en el proceso de fermentación tales como la disponibilidad de nutrientes, la presencia de sales minerales, el pH, la temperatura y la agitación [73].

Dentro de los metabolitos bioactivos aislados de las actinobacterias (Figura 1.3) se han reportados compuestos con actividad antitumoral como la streptokordina aislado de *Streptomyces* sp. obtenida de sedimentos de aguas profundas en Ayu Trough (Océano Pacífico) [74] y la elaiomicina B y C aislados de otra cepa identificada como *Streptomyces* sp. BK190 [75]; compuestos Anti-inflamatorios como la ciclomarina, péptido cíclico aislado de *Salinispora arenicola* aislada en muestras de sedimentos marinos en la isla de Palau [76] y las salinamidas A y B aisladas de *Streptomyces* sp. CNB-091 recuperado de la superficie de la medusa *Cassiopeia xamachana* en la Florida [77]. También se encuentran reportes de compuestos con actividad antimalarica como la trioxacarcina aislada de *Streptomyces* sp. B8652 obtenida de sedimentos marinos del Golfo de México [78] y antiparasitarios como las avermectinas [79], compuestos reconocidos con el premio Nobel de medicina en el año 2015, ya que a partir de ellas se han desarrollado productos con propiedades antinematodos (oncocercosis) y anti-filariosis linfática (elefantiasis).

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

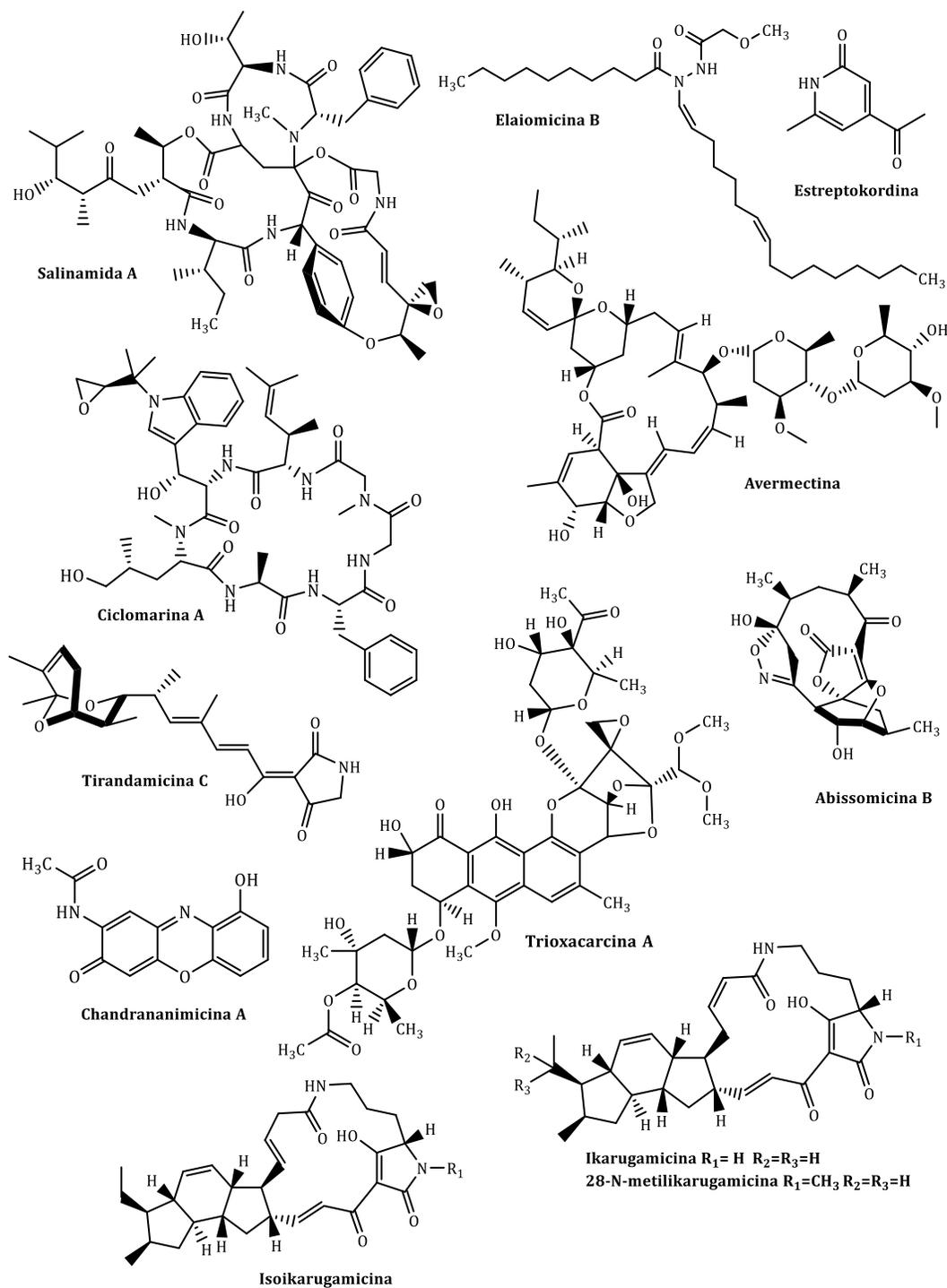


Figura 1.3 Ejemplos de metabolitos bioactivos aislados de actinobacterias

Algunos de los ejemplos de compuestos antimicrobianos producidos por actinobacterias incluyen a la abissomicina producida por una cepa de *Verrucosispora* sp. recuperada de sedimentos marinos en Japon [80], la ikarugamicina y sus derivados (isoikarugamicina, y 28-N-metilkarugamicina), producidos por *Streptomyces zhaozhouensis*, cepa recuperada de sedimentos marinos en Utonde, Guinea Ecuatorial [81], así como la tirandamicina aislada de *Streptomyces* sp. 307-9 [82] y los compuestos chandrananimicina A-C aislados de *Actinomadura* sp. recuperada de sedimentos marinos en China [83].

1.3.4 Productos naturales de actinobacterias marinas como controladores de fitopatógenos

Aunque son varios los ejemplos de moléculas aisladas de actinobacterias que han mostrado ser activas contra fitopatógenos, los reportes de moléculas activas a partir de microorganismos marinos no son tantos. Esto se debe en parte a que estos ambientes son relativamente poco explorados, pero principalmente obedece a que la mayoría de actividades biológicas evaluadas buscan su aplicación como posibles fármacos, mientras que un porcentaje menor evalúa alguna aplicación agrícola [84].

Una de las moléculas que ha sido empleada en el sector agrícola como controlador de fitopatógenos es la Kasugamicina (Figura 1.4), un fungicida y bactericida. Este compuesto fue obtenido inicialmente de *Streptomyces kasugaensis* aislado de suelos en Nara (Japon) [85], y posteriormente se aisló de *S. rutgersensis subsp. gulangyunensis* obtenido de sedimentos marinos en Xeamen (China) [86]. Se comercializa en Japón como su clorhidrato, en forma de polvo o en formulaciones granulares con los nombres comerciales de Kasugamin y Kasumin (Hokko).

Se utiliza para el control del tizón del arroz y otras enfermedades causadas por bacterias en este cultivo. También se ha implementado su uso en cultivos de frutas y hortalizas, para controlar por ejemplo, la mancha de la hoja de la remolacha y del apio. Este compuesto inhibe el crecimiento de las hifas en *Pyricularia oryzae* en el arroz e inhibe fuertemente la esporulación de *Fulvia fulva* en cultivos de tomates [46]. El compuesto se enlaza a las subunidades ribosomales 30S y 70S, inhibiendo la incorporación de los aminoácidos en el ribosoma evitando la biosíntesis de las proteínas [87], [88]. Al igual que otros antibióticos aminoglucósidos, la Kasugamicina presenta muy bajos niveles de toxicidad en mamíferos [89].

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

En otro estudio, Isono y colaboradores aislaron de *Streptomyces cacaoi* var. *Asoensis* los primeros miembros de las polioxinas, una clase de fungicidas naturales que actúan interfiriendo la síntesis de la pared celular de los hongos al inhibir la quitina sintasa. Inicialmente esta cepa fue aislada de suelos y posteriormente se reportó en asociación con esponjas marinas en Japón. La polioxina B se aplica contra una serie de patógenos fúngicos en frutas, vegetales y plantas ornamentales, mientras que la polioxina D (Figura 1.4) se utiliza para controlar el agente causante del blanqueamiento de la panícula de arroz [90].

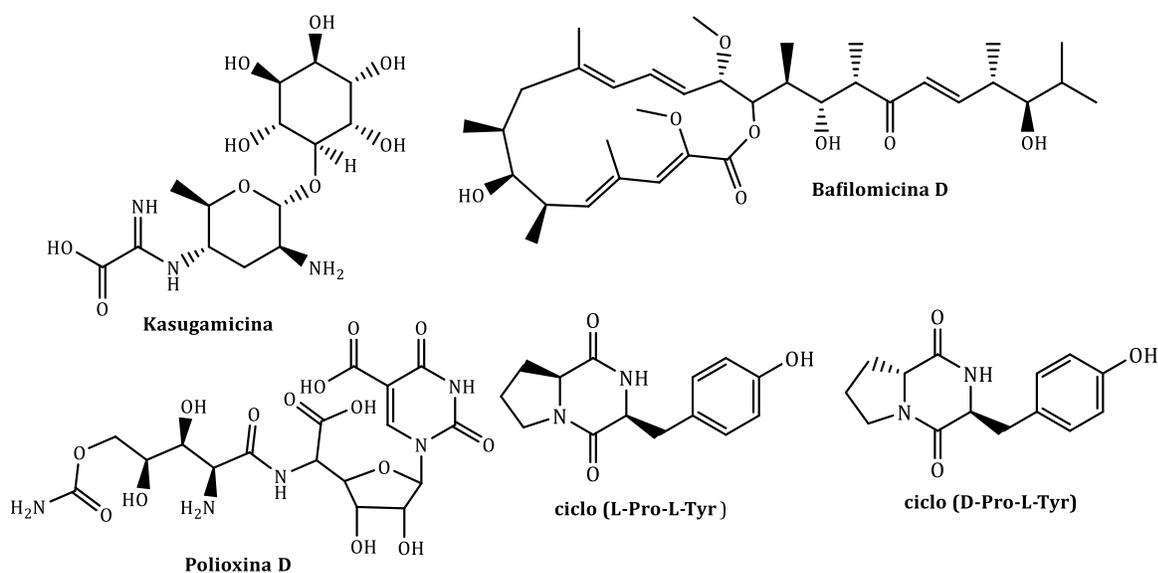


Figura 1.4 Estructura de compuestos bioactivos de actinobacterias marinas

La bafilomicina, un compuesto con actividad antifúngica y antibacteriana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas fue aislado de *Streptomyces cavourensis*, cepa recuperada del mar del sur de China [91], [92].

En la revisión de literatura, también llama la atención la actividad antifúngica de la dicetopiperazinas (DKPs) como la *ciclo*-[L-Pro-L-Tyr]. En 2016 se reportó la actividad antibacteriana de la *ciclo*-[L-Pro-L-Tyr] y *ciclo*-[D-Pro-L-Tyr]] (Figura 1.4), contra tres fitopatógenos que afectan cultivos de importancia económica mundial (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Ralstonia solanacearum* y *Clavibacter michiganensis*) [93]. Estos

dipéptidos que presentan gran diversidad estructural y funcional los producen de forma natural gran variedad de microorganismos, entre ellos varias especies de *Streptomyces*. Se han evaluado algunas de sus potenciales aplicaciones como antivirales, inmunosupresores, antitumorales, inhibidores del *quorum sensing* y sus posibles usos como herbicidas, antibacterianos y fungicidas [94].

1.3.5 Estudio de microorganismos marinos en Colombia

En lo que respecta a nuestro país, sabemos que Colombia cuenta con una diversidad marina inmensa que solo ha sido estudiada parcialmente a través de esfuerzos particulares de investigadores colombianos y extranjeros, pero no de manera sistemática. Trabajos como los realizados por el grupo de Ute Hentschel et al, en 2011, reportaron la actividad anti-proteasa e inmunomodulatoria de actinobacterias asociadas a las esponjas *A. clathrodes*, *Aplysina insularis*, *Agelas tubulata*, *Biemna cribaria*, *A. crassa*, *Discodermia dissoluta*, *S. ruetzleri*, *Dracmacidon reticulata*, *I. felix*, *Monanchora arbuscula*, y *Plakinastrella onkodes*, las cuales fueron recolectadas en El Morro, Bahía de Santa Marta, Colombia. Dentro de los aislamientos recuperados que presentaron actividad figuran aislamientos identificados como *Micromonospora coxensis*, *Saccharopolyspora shandongensi* y *Rhodococcus sp.* [95].

El grupo de investigación “Estudio y aprovechamiento de productos naturales marinos y frutas de Colombia” donde se ha desarrollado el presente trabajo, cuenta con amplia experiencia en el estudio de invertebrados de marinos como productores de compuestos bioactivos. Las investigaciones desarrolladas por el grupo se han enfocado en la bioprospección y recolección de esponjas y octocorales con la posterior extracción, aislamiento y potenciales aplicaciones de sus compuestos químicos. Enfocándonos en encontrar además de los compuestos activos derivados de estos organismos, una solución al problema del suministro de estas moléculas de interés se ha establecido en nuestro grupo de investigación la línea de microbiología marina, que pretende evaluar el uso de microorganismos marinos como fuente de compuestos con actividad biológica.

Dentro de los trabajos realizados en nuestro grupo de investigación, se desarrolló un primer estudio que permitió el establecimiento de una colección de 40 microorganismos recuperados del octocoral *Antillologorgia elisabethae* la cual incluyó especies de los Phylum *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Proteobacteria*. Adicionalmente, se implementó una estrategia metodológica para

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

acelerar y simplificar la detección e identificación de los compuestos producidos por la colección de bacterias antes mencionada. El proceso involucró la miniaturización de los cultivos bacterianos, la extracción en fase sólida de los productos usando la resina Diaion HP-20, el análisis por UPLC-MS de los mismos y finalmente la generación de una librería que permitió detectar 46 compuestos producidos por bacterias y la posterior identificación parcial de 10 de ellos, haciendo uso de la base de datos Antibase 2007™ como herramienta de derreplicación de las sustancias detectadas [96].

A partir de la colección de microorganismos obtenida de este mismo octocoral, se estudiaron quince cepas bacterianas del phylum *Firmicutes*, las cuales fueron evaluadas como una nueva fuente sostenible de compuestos inhibidores de *quorum sensing* (IQS) usando *Chromobacterium violaceum* como biosensor. Las fracciones metanólicas de los aislamientos identificados como *Jeotgalicoccus halophilus* y *Oceanobacillus profundus* fueron las más activas, lo cual sugiere que los compuestos no polares pueden ser los responsables de esta actividad. Como resultado del estudio químico de *Jeotgalicoccus halophilus* se logró el aislamiento de 5 compuestos con actividad IQS: 4-(metiltio) fenol, p-hidroxibenzaldehído, 3-indolaldehído, (1H-indol-3-il) oxoacetamida y la 2-metilpropanoamida. Del estudio químico del extracto orgánico de *O. profundus* se logró el aislamiento de tirosol y acetato de tirosol con actividad IQS [97].

En otro de los trabajos realizados, a partir de los extractos orgánicos de una cepa de *Bacillus cereus* RKHC09, aislada de este mismo coral blando, se lograron aislar dos compuestos nuevos: el tetrapéptido *ciclo*-[L-fenilalanil-*trans*-4-hidroxi-L-prolil-L-leucil-*trans*-4-hidroxi-L-prolina] denominada cereusitina A, el cual presentó una actividad moderada contra el fitopatógeno del ñame *Colletotrichum gloeosporioides* y la 4-(*R*)-hidroxisatabacina, además de los ésteres metílico, isopropílico y el propílico del ácido p-hidroxibenzóico (parabenos). De ellos, el metil y el propil éster presentaron actividad antimicrobiana contra *S. aureus* ATCC 33591 and *S. cerevisiae*, con una MIC de 2 μ M [98].

En el marco anterior, vemos como en Colombia, los estudios de microorganismos marinos como fuente de compuestos bioactivos, hasta ahora se están empezando a realizar, por lo que

resultan una fuente altamente promisoría de compuestos con aplicaciones agroindustriales. Buscando aportar al conocimiento de la diversidad metabólica ofrecida por estos microorganismos, en particular por las actinobacterias, un tema importante a nivel mundial y muy poco explorado en Colombia, en esta tesis doctoral se presenta a continuación la obtención de una colección de actinobacterias aisladas de ambientes marinos del Caribe colombiano como fuente de compuestos con actividad antibacteriana y antifúngica frente a cepas de fitopatógenos con incidencia en cultivos de importancia económica para el país.

2. Identificación de actinobacterias a partir de una colección de microorganismos aislados de ambientes marinos del mar Caribe colombiano.

2.1 Introducción

Uno de los principales problemas a los que se enfrentan los programas de bioprospección marina se refiere a la baja cantidad de microorganismos marinos cultivables. Durante mucho tiempo a este fenómeno se le denominó "anomalía del recuento de placas" debido a la diferencia de varios órdenes de magnitud entre el número de colonias que crecían en cultivos de laboratorio y el número total de bacterias que podían ser contados por métodos como la microscopía de epifluorescencia. Se encontró que por métodos estándar se logra la recuperación de una proporción muy pequeña de microorganismos del orden de 0,001-1% del conjunto total [99].

Un segundo problema, relacionado con el anterior hace referencia al hecho de que los microorganismos más abundantes en los mares tampoco son precisamente aquellos que se pueden cultivar fácilmente por procedimientos microbiológicos estándar. De hecho, los organismos más abundantes en el agua de mar, con frecuencia no son los mismos microorganismos que se encuentran cultivados en los laboratorios, faltando aun cultivos representativos de muchas de las Bacterias y Archaea abundantes en los océanos [100]. Un ejemplo de lo anterior fue descrito en un estudio sobre la biodiversidad de las aguas del Canal Ingles. La bacteria marina (*Candidatus 'Pelagibacter ubique'*, SAR11) perteneciente a *Alphaproteobacteria*, es considerada el organismo más abundante del planeta, presente en el 25% de las secuencias 16S rRNA recuperadas. Aunque durante el estudio las secuencias de esta bacteria fueron las predominantes, se encontró un alto porcentaje de OTUs (>al 78%) que sólo se registraron una única vez en un momento determinado del muestreo, lo cual indica que

en el agua de mar existe un amplio conjunto de nuevas bacterias que aún no se han descrito, y que ofrecen un alto potencial para el desarrollo de los programas de bioprospección [100], [101].

Con este antecedente, desde la perspectiva de la ecología microbiana, se ha tenido como prioridad el desarrollo de metodologías que permitan caracterizar el mayor número de bacterias como sea posible. Uno de los grandes progresos en ese aspecto fué la introducción de técnicas de biología molecular en el campo de la ecología microbiana marina [102]. Como consecuencia de estos desarrollos en las nuevas capacidades de secuenciación, existen bases de datos en continua expansión que contienen gran cantidad de secuencias del gen 16S de bacterias aisladas de ambientes marinos, posibilitando un conocimiento más amplio sobre los grupos bacterianos presentes en los océanos [103].

Otras aproximaciones permiten la expresión heteróloga o la sobreexpresión de algunos de los genes potencialmente aprovechables. La sobreexpresión de un gen se basa en la introducción de una o varias copias extra de dicho gen en el organismo silvestre mientras que la expresión heteróloga, se basa en la expresión de un gen o de varios genes de una ruta biosintética de un organismo en otro organismo no productor [104].

Si bien es posible acceder a la información genética de los microorganismos no cultivados a través de la genómica, es claro que el potencial de cualquier microorganismo es más fácilmente evidenciable si se cuenta con ese microorganismo para la experimentación en el laboratorio [105]. Incluso en esta época donde la secuenciación del ADN es fundamental, los cultivos puros siguen siendo indispensables puesto que representan la única forma que tenemos para describir la fisiología de los microorganismos, lo cual incluye, entre otras, establecer qué sustratos orgánicos utilizan, determinar qué metabolitos secundarios pueden ser producidos y cuáles biotransformaciones podrían ser posibles. De hecho, se requiere de un cultivo puro para lograr la caracterización taxonómica completa y dar un nombre al microorganismo.

Entre algunos de los problemas que se deben afrontar para lograr el cultivo de bacterias aisladas de ambientes marinos están [106], [107]:

i) El cultivo a nivel de laboratorio destruye las interacciones que se producen entre los organismos en su medio natural. Eso causa que las especies de más rápido crecimiento pueden

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

invadir a las que crecen muy lentamente. También podría llevar a la producción compuestos inhibidores del crecimiento, que derivaría en la inactivación de las células por parte de otros microorganismos que lo rodean. Se ha considerado que esto es una de las posibles causas de la baja recuperación de microorganismos.

ii) Las bacterias pueden ser incapaces de crecer en el sustrato o en la combinación de sustratos proporcionados. En términos generales existe poco conocimiento de los sustratos orgánicos o concentraciones que se pueden suministrar, pues son aún pocas las bacterias marinas que se encuentran cultivadas.

iii) Las concentraciones de sustrato que son necesarias para lograr un crecimiento detectable en el laboratorio, pueden ser por sí mismas tóxicas, en particular para las bacterias marinas que han evolucionado en condiciones oligotróficas.

iv) Las prácticas de laboratorio comunes tienden a descuidar la primera ronda de cultivos en medios líquidos que aparentemente no muestran un crecimiento visible.

Desde esta perspectiva, el establecimiento de cultivos puros de representantes de las diferentes divisiones bacterianas, se convierte en uno de los principales desafíos para bioprospección marina, a la vez que el establecimiento de colecciones de microorganismos, es resulta esencial para el desarrollo de este tipo de programas de bioprospección [108].

2.1.1 Las colecciones de microorganismos

Las colecciones de microorganismos no sólo son importantes para la conservación de la información genética de los microorganismos, sino que también desempeñan un papel crucial apoyando los campos de la taxonomía y la biodiversidad microbiana.

Para el mantenimiento de los cultivos antes mencionados, estos deben permanecer puros y homogéneos bajo condiciones que aseguren la estabilidad microscópica, macroscópica, bioquímica, fisiológica y genética [109]. Dentro de los tipos de colecciones que podemos encontrar figuran las colecciones especializadas y las colecciones de servicio. Las colecciones especializadas, son de uso particular de un centro de investigación o laboratorio específico,

contando con un número limitado de cepas. Entre ellas también figuran las colecciones industriales, que cuentan con cepas para un proceso determinado.

Cuando se habla de conservación de cepas microbianas se hace referencia al grupo de individuos relacionados que tienen ciertas características que lo distinguen de otros grupos o a líneas de organismos descendientes o derivados de un ancestro individual [110]. Entre los principales objetivos al realizar el proceso de conservación de los microorganismos, es mantener la viabilidad y reducir la contaminación con otros microorganismos, de manera que la cepa conservada sea semejante a la original; conservar las propiedades de importancia de los cultivos; minimizar la ocurrencia de cambios genéticos; reducir el riesgo de contaminación y preservar la pureza del cultivo. Un cepario entonces, es un conjunto de alícuotas homogéneas de cultivos puros que se almacenan bajo condiciones que garanticen viabilidad, pureza, actividad, características fenotípicas y genotípicas [111].

Las clases de cepas que se pueden conservar en una colección son cepas de referencia, cepas de reserva y cepas de trabajo [112]. El número de repiques a partir de una cepa de referencia es usualmente limitado (máximo 5) a la vez que es recomendable no subcultivar las cepas de trabajo [113]. Entre los métodos de conservación microbiana se encuentran la conservación a corto y a largo plazo. La conservación a corto plazo, se caracteriza por la transferencia periódica de las cepas a medios de cultivo fresco. Los periodos de duración de las cepas por esta metodología son inferiores a dos años. La conservación a largo plazo puede ser por congelación o por liofilización. Los tiempos de duración de los aislados por estos métodos pueden ser mayores a 10 años [114]-[116].

2.1.2 Prospección biológica de microorganismos en Colombia

En nuestro país, la búsqueda de nuevas alternativas biológicas frente a problemas en las áreas de la salud, agricultura y medio ambiente, ha motivado la creación de colecciones de microorganismos en diferentes instituciones, entre ellas se puede citar a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA) que mediante convenio con el Ministerio de Agricultura y el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) administra el Banco de Germoplasma de Microorganismos el cual conserva accesiones de especies nativas de importancia para el sector agropecuario [117].

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

Universidades como La Pontificia Universidad Javeriana cuenta con una colección que conserva hongos y bacterias de interés clínico, biotecnológico, industrial y ambiental [118]. El Centro de Investigaciones Microbiológicas-CIMIC de la Universidad de los Andes tiene una colección de bacterias enfocada a la utilización de los microorganismos en procesos de aplicación ambiental[119]. La Colección de Microorganismos de la Universidad Católica de Manizales – CMUCM esta constituida por cuatro sub-colecciones: Clínica, Agrícola, Industria y Referencia [120].

El Banco de Cepas y Genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN) cuenta cepas con uso agrícola, industrial, productoras de biopolímeros y patógenos tanto de humanos como de plantas. Conserva cepas de referencia y microorganismos de diferentes líneas de investigación del Instituto de Biotecnología, que constituyen la base de futuras investigaciones [121].

En lo que respecta a trabajos de bioprospección de microorganismos en Colombia, se encontró un estudio realizado en sedimentos del río Guaviare, donde reportaron abundancia de actinobacterias cultivables. Siete de las cepas aisladas, son potencial fuente de compuestos antimicrobianos, demostrando diferencias en sus perfiles genotípicos y fenotípicos en comparación con sus vecinos más próximos (*Streptomyces* y *Kitasatospora*), lo cual podría indicar que se trata de nuevas especies [122].

En otro estudio, se determinó la composición de la comunidad bacteriana de manantiales salinos ubicados en los departamentos de Risaralda y Boyacá, encontrando que a partir de las diferentes series de cultivo se aislaron y purificaron 62 cepas bacterianas. Los organismos aislados se identificaron taxonómicamente en los filos *Proteobacteria* (*alfa*, *delta* y *gama*), *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Synergistetes* y *Actinobacteria* (una cepa relacionada con el género *Cellulomonas*) [123]. Este mismo grupo de investigación, realizó la cuantificación, aislamiento e identificación de comunidades anaerobias amilolíticas de un manantial termomineral de Paipa, Boyacá, aislando 8 cepas bacterianas. Se analizó la secuencia del gen 16S rRNA de dos de las cepas aisladas indicando que pertenecen a la familia *Thermoanaerobiaceae* del dominio *Bacteria* [124].

Dentro de las investigaciones realizadas por el INVEMAR (Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras), se obtuvo una colección de 82 cepas a partir de muestras de sedimento del Caribe colombiano capaces de tolerar los contaminantes orgánicos persistentes en ambientes aerobios. De estas cepas, 64 sobrevivieron las condiciones de laboratorio. Las cepas fueron identificadas mediante el gen 16S rRNA encontrando bacterias de los géneros *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Ralstonia* [125].

En este capítulo, se presentará la obtención de una colección de microorganismos aislados de diferentes muestras recolectadas en el Mar Caribe colombiano, la cual contribuye a la caracterización de la microbiota presente en el país. A partir de esta colección de microorganismos se realizó la identificación taxonómica de las actinobacterias objeto de estudio del presente trabajo.

2.2 Resultados y discusión

Resulta pertinente aclarar que los resultados aquí reportados para la recuperación de las cepas y para su aislamiento hacen parte de un proyecto perteneciente al grupo de investigación, y que estos fueron desarrollados tanto por la autora de este trabajo como por Sandra Judith Naranjo, quien se encuentra adelantando su trabajo doctoral en la búsqueda de compuestos inhibidores de la comunicación bacteriana (*quorum quenchers*), para lo cual participó en la obtención de la colección de microorganismos, su identificación y realizó la evaluación de dicha actividad contra algunas de las actinobacterias que se aislaron e identificaron en este capítulo.

2.2.1 Aislamiento de bacterias marinas

Para lograr la recuperación de los microorganismos asociados, se estudiaron muestras ambientales provenientes del arrecife de coral de la isla de Providencia y Santa Catalina (Colombia, Sudoeste del Mar Caribe), seleccionado por ser una de las reservas coralinas más conservadas del país a las que tuvimos acceso.

Las muestras de invertebrados, algas o sedimentos se procesaron usando protocolos clásicos que permitieran el aislamiento de actinobacterias cultivables, tales como el uso de los medios

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

de cultivos agar ISP-2 y agar avena, los cuales favorecen el enriquecimiento en actinobacterias [126]. Las muestras incubaron a 30 °C durante dos semanas. Luego de haber detectado el crecimiento de los microorganismos en los dos tipos de agar, éstos se fragmentaron en pequeños trozos y se transfirieron a la solución salina suplementada con CaCO₃, con el fin de mejorar el crecimiento de cepas de actinobacterias [127]. En la actualidad, no se conoce con exactitud el mecanismo de acción del carbonato de calcio; sin embargo, se ha demostrado que al mezclar el carbonato de calcio con las muestras aumenta el pH, lo cual facilita el crecimiento de propágulos de actinobacterias, debido a que los iones calcio tienen la habilidad de estimular la formación del micelio aéreo en diferentes cultivos de actinobacterias [128].

La purificación de los aislamientos bacterianos se realizó por repiques sucesivo de las colonias individuales, empleando el medio de cultivo sólido CSA. De esta purificación, se logró la recuperación de un total de 203 aislamientos: 162 aislamientos fueron descritos como bacterias, mientras que 41 aislamientos presentaron características morfológicas típicas de hongos. Algunos de estos aislamientos (bacterias y hongos) fueron y están siendo trabajados en otras tesis del grupo de investigación, siendo esta una de las contribuciones de esta colección de microorganismos al quehacer investigativo del grupo de trabajo.

2.2.2 Caracterización de bacterias marinas

En diversos estudios se ha reportado que según el medio de cultivo empleado para el crecimiento de los aislamientos bacterianos, se han evidenciado cambios en las características morfológicas del cultivo, especialmente en la coloración de actinobacterias. Por tanto, para realizar la descripción morfológica de los aislamientos, se recomienda el uso de los medios diferenciales del proyecto internacional de *Streptomyces* (ISP) [129], [130].

Esta descripción se realizó empleando los medios de cultivo sólido ISP-2, ISP-3, ISP-4, y agar nutritivo comúnmente usados para la diferenciación de *Streptomyces* (Figura 2.1 y Anexo 1).

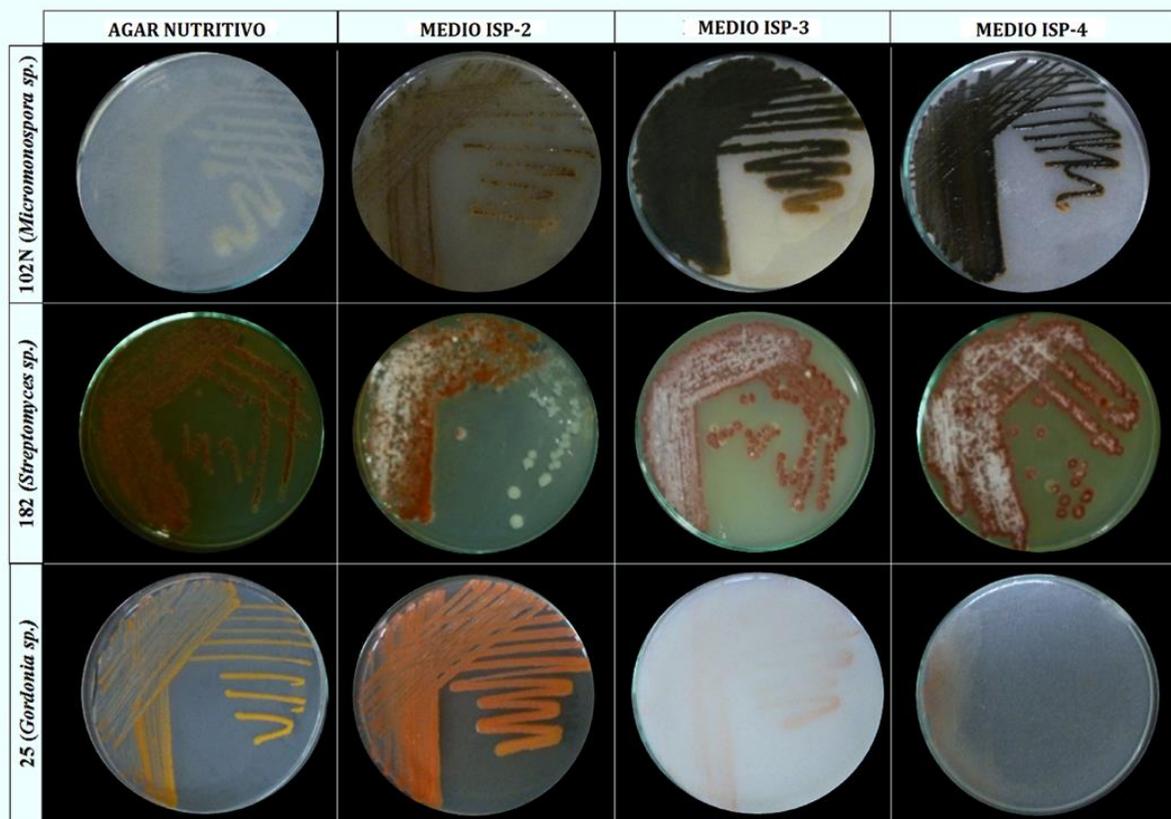


Figura 2.1 Morfología de las colonias en agar nutritivo, ISP-2, ISP-3 y agar ISP-4. Aislamiento PNM-25 (*Gordonia sp.*), aislamiento PNM-102N (*Micromonospora sp.*) y aislamiento PNM-182 (*Streptomyces sp.*)

Las observaciones se realizaron a los 8 días de incubación. Se describió la morfología de las colonias (filamentosas, redondas, pulverulentas, puntiformes, convexas, cóncavas, concéntricas, con bordes regulares e irregulares, entre otras). Cada uno de los aislamientos fue descrito de acuerdo a la coloración del micelio vegetativo y aéreo y la producción de pigmentos en el medio de cultivo tanto en el anverso como en el reverso de las cajas de Petri; si se presentó o no esporulación y su coloración y si se evidenció o no la presencia de exudados.

La Figura 2.2 muestra algunas de las observaciones microscópicas en la coloración de Gram donde se puede corroborar la presencia de filamentos delgados ramificados, fragmentación de la hifa y estructuras en espiral características de las actinobacterias. De acuerdo a su morfología macroscópica (Figura 2.1) y microscópica (Figura 2.2) se encontró que estas 24

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

cepas podrían ser clasificadas como pertenecientes al Phylum *Actinobacteria*. Si bien el objetivo de este trabajo eran las actinobacterias obtenidas de ambientes marinos, también se recuperaron bacterias con características morfológicas macro y microscópicas diferentes a las de actinobacterias, las cuales también fueron conservadas. Estos aislamientos bacterianos, caracterizados entre otras propiedades por presentar crecimiento rápido en medio de cultivo sólido (inferior a 24 horas), podrían contener representantes de otros Phyla de interés como productores de compuestos con posibles aplicaciones para el control de fitopatógenos, como *Proteobacterias* [131] y *Firmicutes* [132] razón por la cual fueron criopreservados a -80°C para posteriores trabajos en el grupo de investigación.

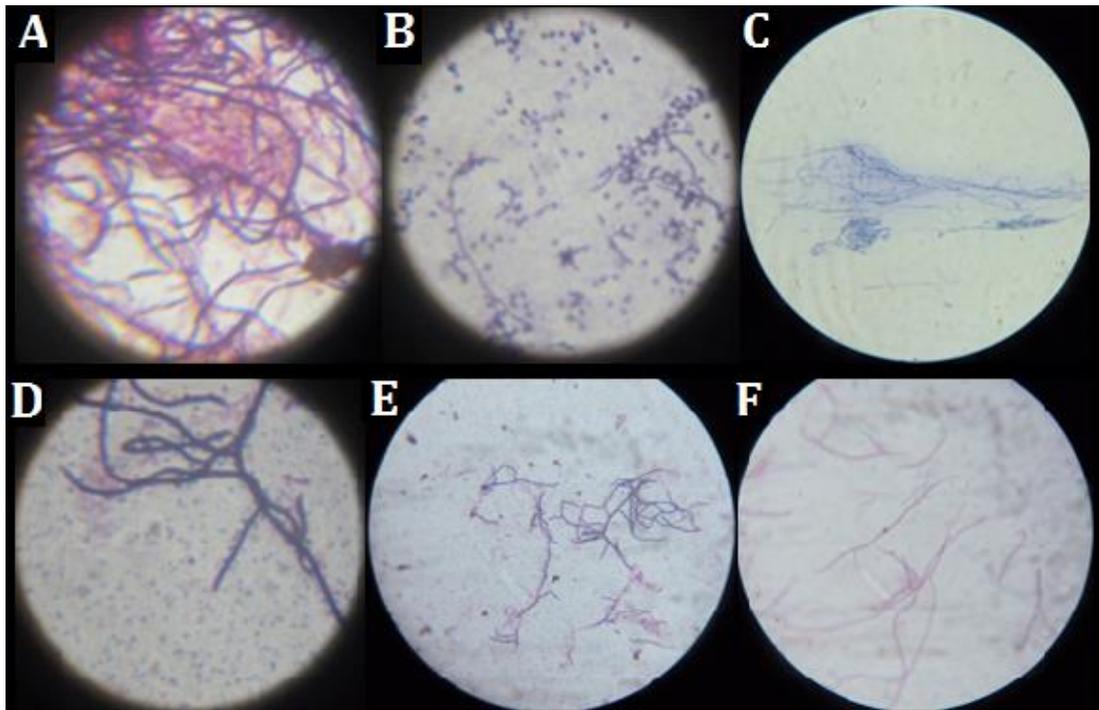


Figura 2.2 Tinción de Gram de algunos de los aislamientos de actinobacterias obtenidos de ambientes marinos observados con el objetivo 100x A) PNM-161A, B) PNM-102N, C) PNM-5, D) PNM-9, E) PNM-208, F) PNM-89.3

En una segunda etapa de la caracterización realizada, a los 24 aislamientos se les evaluó el perfil de producción de los ácidos diaminopimélicos (L,L-DAP y meso LD-DAP), los cuales se encuentran en la pared celular. El ácido L,L- diaminopimélico (LL-DAP) se considera como un

marcador quimiotaxonómico para el género *Streptomyces* [133]. De acuerdo a los resultados (Figura 2.3), se observó que 22 de los aislamientos produjeron hidrolizados con presencia de L,L-DAP, característico de *Actinobacterias* que pertenecen al género *Streptomyces*. Estos 22 aislamientos presentan la formación de micelio de sustrato extensamente ramificado, e hifas aéreas capaces de diferenciarse en cadenas de esporas. Este conjunto de aislamientos resultó de particular interés, dado que es bien sabido que el género *Streptomyces* es una fuente prolífica de metabolitos secundarios [134], [135]. Los restantes dos aislamientos (PNM-25 y PNM-102N) mostraron la presencia del ácido meso-DAP (Figura 2.3), sugiriendo que podría tratarse de aislamientos pertenecientes a géneros diferentes a *Streptomyces* también conocidos como actinobacterias raras.

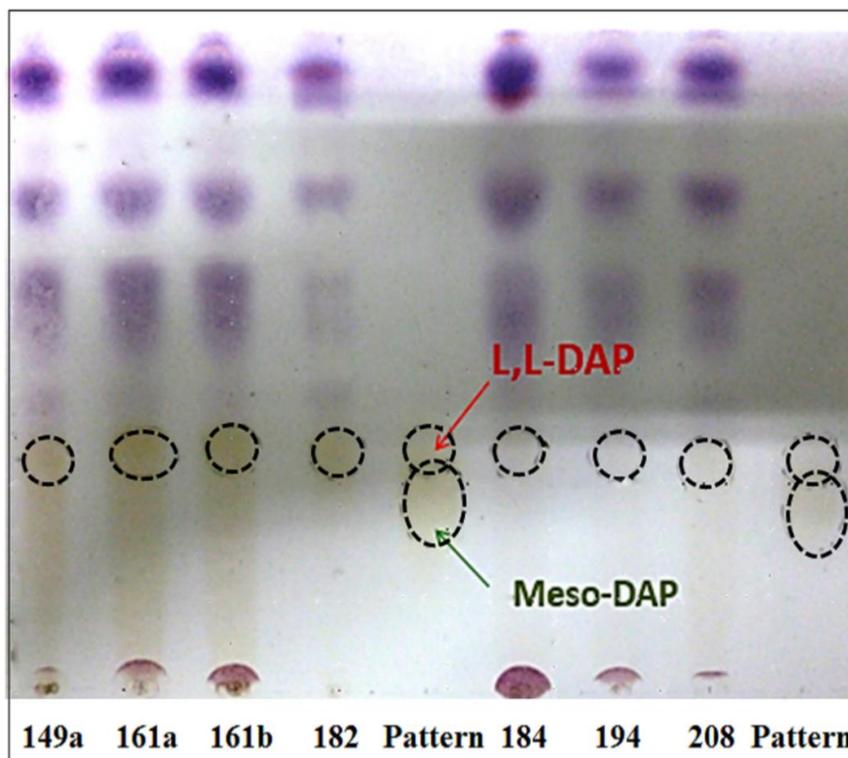


Figura 2.3 Análisis por TLC de ácidos diaminopimélicos, quimiomarcadores en *Actinobacteria*. Placas de Celulosa TLC Merck 20 x 20 cm. Fase móvil: Metanol / agua/ HCl 6N / piridina (80:26:4:10, v/v). Revelador: 0.2% de ninhidrina en acetona

Una tercera etapa de la caracterización de las actinobacterias incluyó la aplicación de pruebas bioquímicas a partir del test API 20E (bioMérieux Inc., Durham, NC). El API 20E es un sistema estandarizado que incluye test bioquímicos miniaturizados para la fermentación y oxidación de azúcares, así como otras pruebas de actividad enzimática. Los microtubos se inocularon con

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

una suspensión bacteriana de cada uno de los aislamientos que reconstituyen los test. Las reacciones producidas durante el periodo de incubación se traducen en cambios de color espontáneos o revelados mediante la adición de reactivos. Después de la incubación, la lectura de la galería se hace remitiéndose a la tabla de lectura que provee el fabricante.

Los resultados de aplicar el test API 20E a los 24 aislamientos puros (Tabla 2.1), permitieron la construcción del perfil bioquímico de cada uno de ellos. Con los resultados del test se agruparon aquellos aislamientos que presentaron el mismo perfil ya que podría tratarse de aislamientos redundantes de la misma especie. Esta información se complementó tanto con los cultivos en los medios diferenciales y se corroboró con la identificación molecular.

Adicionalmente, se realizó la prueba para detectar la presencia de la enzima catalasa a los 24 aislamientos (Tabla 2.1). Esta enzima se encuentra en la mayoría de bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. La prueba se realiza con H_2O_2 al 30 % sobre el microorganismo a temperatura ambiente. La formación inmediata de burbujas se considera como positivo. El resultado del test de catalasa mostró que 23 de los aislamientos evaluados presentaron un resultado positivo. El aislamiento PNM-161b dio negativo para en esta prueba. De forma paralela, se realizó la detección de la citocromooxidasa en los 24 aislamientos usando el kit (Bactident ® Oxidasa MERKC) (Tabla 2.1).

El análisis de los resultados de las pruebas de crecimiento en medios diferenciales, la composición de los ácidos diaminopimélicos y los test API 20E de pruebas bioquímicas para los aislamientos, dio como resultado que las 24 cepas tienen patrones de crecimiento, composición de ácidos diaminopimélicos y actividad bioquímica que permiten diferenciarlas entre ellas, lo que sugiere que los 24 aislamientos no son redundantes (Tabla 2.1). Por ejemplo, aunque las cepas PNM-9 y PNM-5 presentaron el mismo perfil en las pruebas bioquímicas, se consideró a la cepa PNM-9 como diferente de la cepa PNM-5, ya que su morfología en los cuatro medios de cultivo (agar nutritivo, ISP-2, ISP-3, ISP-4,) era distinta a la descrita para la cepa PNM-5. También se encontró que los aislamientos PNM-89.3 y PNM-89.4 presentaron similitud en su perfil bioquímico y solamente difieren en el test de oxidasa.

Tabla 2.1 Test bioquímico para 24 cepas marinas. API 20E Test (bioMérieux Inc., Durham, NC) – Oxidasa - Catalasa - L,L DAP (*Streptomyces*)

TEST/ Cepa	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	NO ₂	oxidasa	catalasa	L,L DAP
143	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
144	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
161a	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
161b	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
25	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-
184	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
208	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
102N	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-
13	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
144a	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
148	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
149	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
149a	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+
87	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
89.3	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
89.4	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
6	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
46b	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
194	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+
3	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+
182	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
145	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
5	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+
9	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+

El test muestra la presencia de: ONPG: β-galactosidasa; ADH: arginina-dihidrolasa; LDC: lisina decarboxilasa; ODC: ornitina decarboxilasa. CIT: utilización de citrato. Producción de: H₂S, URE: Ureasa, TDA: triptofano deaminasa, IND: indol, VP: acetoina, GEL: gelatinasa. El test también permite observar otras características bioquímicas como la fermentación o la oxidación de azúcares (GLU: glucosa, MAN: manitol, INO: inositol, SOR: sorbitol, RHA: rhamnosa, SAC: sucrosa, MEL: melibiosa, AMY: amigdalina y ARA: arabinosa, así como la reducción de nitratos a nitritos.

Con el ánimo de complementar la caracterización morfológica de los aislamientos, se realizó un análisis mediante microscopía electrónica de barrido de algunos de los aislamientos para obtener información adicional sobre las estructuras de las cepas. Por ejemplo, si hay formación de cadenas de esporas o si hay formación de esporas simples, al igual que la morfología de la superficie de las esporas entre otras características típicas de actinobacterias [136]. Algunas de las cepas seleccionadas para este análisis fueron *Streptomyces* sp. PNM-5, *Streptomyces* sp. PNM-9, *Streptomyces* sp. PNM-161a, *Streptomyces* sp. PNM-182 y *Streptomyces* sp. PNM-208.

El análisis de microscopía electrónica de barrido (Figura 2.4 A) reveló que los micelios aéreos produjeron cadenas de esporas en espiral y largas, en donde se observaron las esporas de los aislamientos PNM-5, PNM-182 y PNM-208 (al igual que en los otros dos aislamientos), donde la superficie de las esporas se caracterizó por mostrar ser lisas, rugosas o espinosas.

Estos resultados, además de permitir un mayor conocimiento de las características microscópicas, macroscópicas y bioquímicas de los aislamientos, también pueden ser usados como complemento a la identificación molecular siendo fuente de comparación en caso de problemas de clasificación taxonómica. Los procedimientos anteriores permitieron una clasificación tentativa de los 24 aislamientos como pertenecientes al Phylum *Actinobacteria* los cuales representan cerca del 15% del total de los 162 aislamientos bacterianos recuperados de las muestras de origen marino tomadas en este trabajo.

Si se compara con otros trabajos realizados en esta área a nivel mundial, por ejemplo la recuperación de 79 actinobacterias a partir de 18 esponjas del Caribe [95] y las 64 actinobacterias recuperadas de 12 muestras de esponjas, nuestra recuperación fue baja [137]. Sería recomendable que para futuros muestreos se puedan emplear metodologías que permitan disminuir la flora acompañante y que favorezcan el crecimiento de actinobacterias, tales como la adición de antibióticos en los medios, realizar pretratamientos con calor seco, utilizar medios de cultivo con diferentes composiciones y almacenar las muestras de sedimentos de aguas profundas a -80°. Estos procedimientos han resultado ser efectivos para prevenir la aparición de bacterias de rápido crecimiento [38].

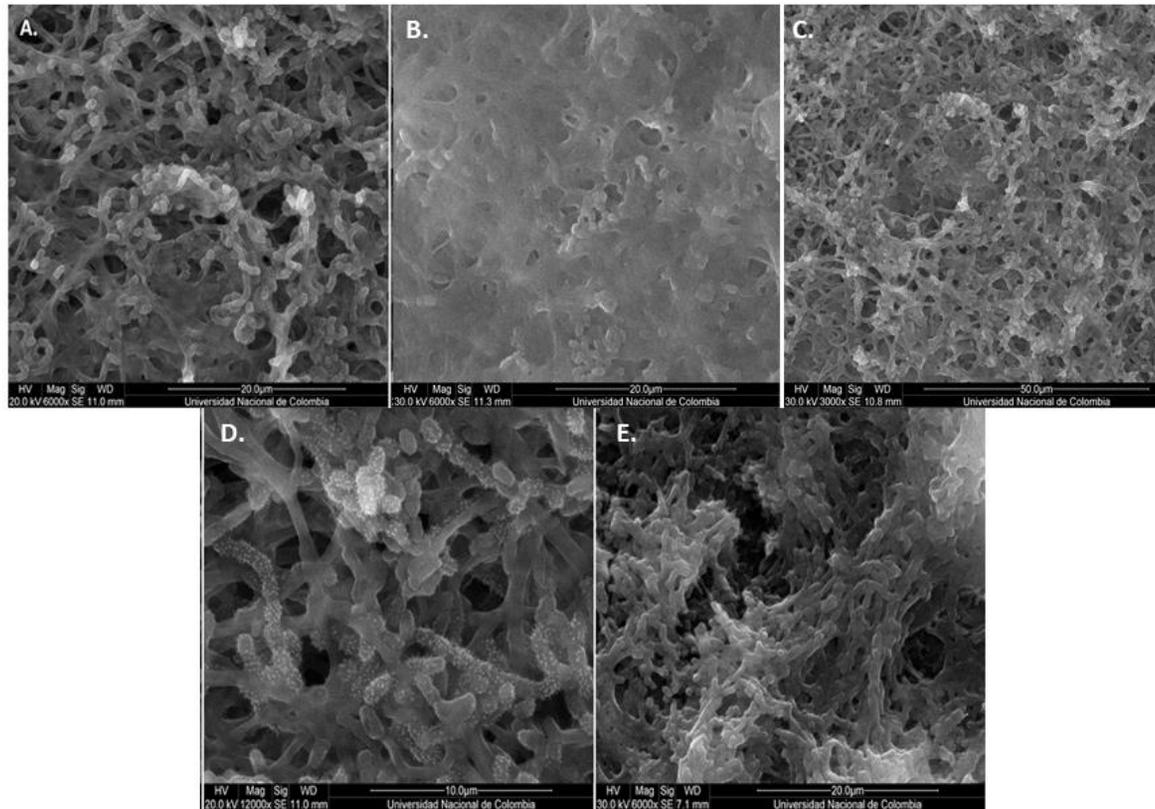


Figura 2.4 Microscopia electrónica de barrido (SEM) de los aislamientos PNM-5(A), PNM-9 (B), PNM-161a (C), PNM-182 (D) y PNM-208 (E) cultivados en agar ISP-2 donde se observan las cadenas de esporas y su superficie

Identificación molecular de las cepas seleccionadas (16S rRNA) y MALDI-TOF

En cuanto a la identificación molecular de los aislamientos, los resultados del análisis del gen 16S rRNA presentados en la Tabla 2.2 y en el árbol filogenético de la Figura 2.5 (> 1400 pb pares de bases de longitud) indican que todos los 24 aislamientos seleccionados previamente se encuentran filogenéticamente relacionados al phylum *Actinobacteria*, y están representados por tres géneros diferentes así: *Streptomyces* (22 aislamientos), *Gordonia* (un aislamiento, PNM-25) y *Micromonospora* (un aislamiento, PNM-102N). Estos resultados concuerdan con los resultados presentados previamente en las pruebas del perfil bioquímico, quimiotaxonómico y de crecimiento, mostrando además que sus fenotipos son consistentes con sus genotipos 16S rRNA. En futuros trabajos de nuestro grupo de investigación, se espera lograr la identificación taxonómica de estos aislamientos a nivel de especie.

En la Tabla 2.2 también se presentan sus vecinos más cercanos y el porcentaje de similitud para cada una de las 24 actinobacterias y en el árbol filogenético basado en el 16S rRNA (Figura 2.5) se puede apreciar la formación de siete unidades taxonómicas operacionales (OTU por sus siglas en inglés).

Un total de once aislamientos identificados como *Streptomyces* sp. PNM- 3, 6, 13, 87, 89.3, 89.4, 161a, 161b, 184, 194 y 208 se encuentran formando el primer clado (OTU 1). Este primer clado esta compuesto principalmente por cepas que fueron recuperadas de cinco muestras diferentes; *Niphates digitalis*, *Bryopsis* sp., *Eunicea fusca* y sedimentos, (Tabla 2.2). Debido a lo anterior estas cepas no fueron consideradas aislamientos redundantes. Los vecinos más cercanos de estas cepas han sido recuperados principalmente de muestras de suelo. Solamente *S. albidoflavus* (99.86% de similitud) ha sido recuperado tanto de ambientes marinos como de suelo y exhibe tanto actividad antifúngica como antibacteriana [138], [139]. Dos de los vecinos cercanos, *S. violacens* (99.86% Similitud) y *S. resistomycifus* (99.86% Similitud) han demostrado tener actividad antibacteriana y se ha reportado que cepas de *S. violascens* producen antibióticos peptídicos como la actinomicina [140]. Los otros vecinos cercanos *S. griseochromogens* (99.86% Similitud), productor del antibiótico Blastocidina S el cual presenta actividad frente a hongos fitopatógenos del arroz [141] y *S. hydrogenans* (99.86% Similitud), quien produce metabolitos con actividad antifúngica contra el hongo fitopatógeno *Alternaria brassicicola* [141].

Tabla 2.2 Afiliación de cepas de *Actinobacterias* aisladas de muestras marina

Cluster (OTU)	Número de la cepa	Identidad asignada a nivel de género	Vecino mas próximo	% de similitud	Número de acceso al GenBank	Fuente de donde fue aislada
1	3	<i>Streptomyces</i> sp.			KX641378	<i>Niphates digitalis</i> (Porifera)
	6	<i>Streptomyces</i> sp.			KX641383	<i>Niphates digitalis</i> (Porifera)
	13	<i>Streptomyces</i> sp.			KX641381	Sedimento
	87	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Streptomyces griseochromogenes</i>	99,86	KX641385	<i>Niphates digitalis</i> (Porifera)
	89,3	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Streptomyces violascens</i>	99,86	KX641386	<i>Niphates digitalis</i> (Porifera)
	89,4	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Streptomyces resistomycificus</i>	99,86	KX641387	<i>Niphates digitalis</i> (Porifera)
	161a	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Streptomyces hydrogenans</i>	99,86	KX641396	<i>Bryopsis</i> sp. (Chlorophyta)
	161b	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Streptomyces albidoflavus</i>	99,86	KX641397	<i>Bryopsis</i> sp. (Chlorophyta)
	184	<i>Streptomyces</i> sp.			KX641399	<i>Eunicea fusca</i> (Gorgonacea)
	194	<i>Streptomyces</i> sp.			KX641400	Sedimento
208	<i>Streptomyces</i> sp.			KX641401	<i>Eunicea fusca</i> (Gorgonacea)	
2	182	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Streptomyces</i> sp. MBRL172	99,03	KX641398	<i>Amphiroa</i> sp. (Rhodophyta)
3	9	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Streptomyces pratensis</i>	100	KX641380	<i>Dictyota</i> sp. (Phaeophyta)
4	46b	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Streptomyces microflavus</i>	99,86	KX641384	<i>Codium</i> sp. (Chlorophyta)
			<i>Streptomyces fulvorobeus</i>	99,86		
5	5	<i>Streptomyces</i> sp.			KX641379	<i>Niphates digitalis</i> (Porifera)
	143	<i>Streptomyces</i> sp.			KX641389	<i>Niphates digitalis</i> (Porifera)
	144	<i>Streptomyces</i> sp.			KX641390	<i>Niphates digitalis</i> (Porifera)
	144a	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Streptomyces sanyensis</i>	99,72	KX641391	<i>Niphates digitalis</i> (Porifera)
	145	<i>Streptomyces</i> sp.			KX641392	<i>Niphates digitalis</i> (Porifera)
	148	<i>Streptomyces</i> sp.			KX641393	<i>Niphates digitalis</i> (Porifera)
	149	<i>Streptomyces</i> sp.			KX641394	<i>Niphates digitalis</i> (Porifera)
	149a	<i>Streptomyces</i> sp.			KX641395	<i>Niphates digitalis</i> (Porifera)
6	102N	<i>Micromonospora</i> sp.	<i>Micromonospora chalcea</i>	99,79	KX641388	<i>Dictyota</i> sp. (Phaeophyta)
			<i>Micromonospora maritima</i>	99,38		
			<i>Micromonospora sediminicola</i>	99,15		
			<i>Micromonospora marina</i>	99,44		
7	25	<i>Gordonia</i> sp.	<i>Gordonia bronchialis</i>	98,41	KX641382	<i>Xestospongia</i> sp. (Porifera)

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

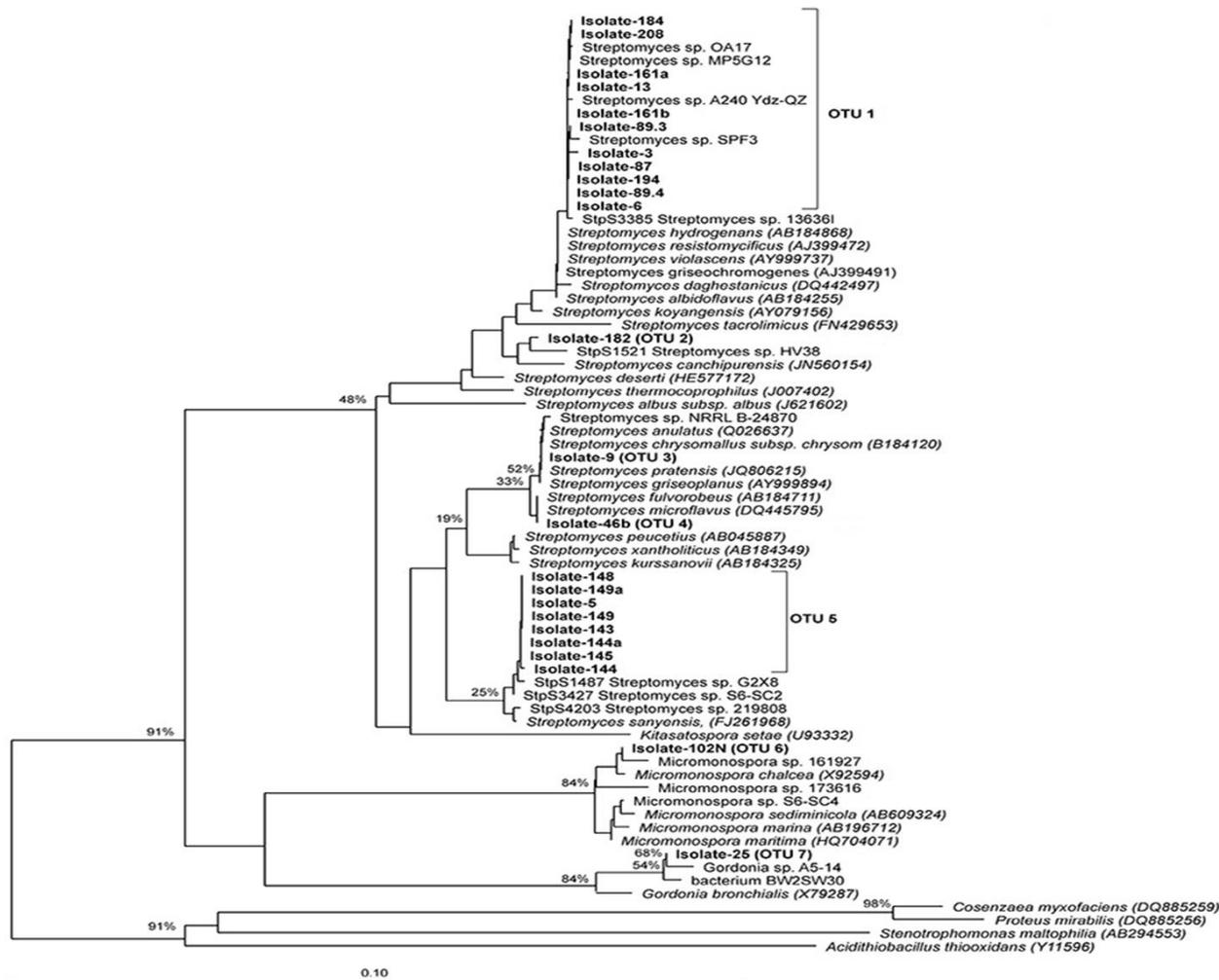


Figura 2.5 Árbol filogenético basado en el gen 16S rRNA y sus vecinos

Los aislamientos identificados como *Streptomyces* sp PNM-5, 143, 144, 144a, 145, 148, 149 y 149a se agruparon en el mismo cluster (OTU 5) y se recuperaron de la muestra de la esponja *Niphates digitalis*. El vecino más cercano a este grupo fue *Streptomyces sanyensis* (99.72% Sim) el cual se ha recuperado de sedimentos de manglar en Sanya, provincia de Hainan, China y cuyo extracto presentó actividad antimicrobiana [144], [145]. Sin embargo, a pesar de las similitudes descritas, también se observaron varias diferencias entre sus perfiles bioquímicos y en sus morfologías en los medios diferenciales ISP, por lo cual se consideraron como aislamientos diferentes.

Otros cinco aislamientos se agruparon en cinco cluster individuales así:

(i) *Streptomyces* sp. PNM-182 (OTU 2), es una cepa aislada de *Amphiroa* sp. y está relacionada con *Streptomyces canchipurensis* (99.03 % Similitud) [146].

(ii) *Streptomyces* sp. PNM-9 (OTU 3), fue aislada de una muestra del alga parda *Dictyota* sp. y está relacionada con *Streptomyces pratensis* (100 % Similitud), la cual se ha recuperado de ambientes terrestres y aún no cuenta con reportes sobre su actividad biológica [147].

(iii) *Streptomyces* sp. PNM-46b (OTU 4), aislada de *Codium* sp. y está relacionada con *Streptomyces microflavus* (99.86% Similitud) y *Streptomyces fulvorobeus* (99.6 % Sim). Se ha reportado que *S. microflavus* ha sido recuperada tanto de mar como de suelos, mientras que *S. fulvorobeus* sólo ha sido aislada de ambientes marinos [148]. Ninguna de estas dos cepas cuenta con reportes de su actividad antimicrobiana.

(iv) El aislamiento PNM-102N (OTU 6) tiene como vecinos más cercanos, representantes del género *Micromonospora*. Las especies pertenecientes al género *Micromonospora* se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Se han aislado de diversos ambientes, como suelos, tejidos vegetales, insectos, sedimentos marinos, esponjas entre otros [149]. El género *Micromonospora* se ha venido reconociendo de forma gradual, como una fuente importante de metabolitos secundarios. De éste género se han reportado cerca de 500 moléculas diferentes, con diversas estructuras y propiedades principalmente antibióticas [150]. Recientemente se demostró que estas especies también pueden influir en el crecimiento y desarrollo de las plantas [11]. Además, las especies de *Micromonospora* tienen la capacidad de producir enzimas hidrolíticas, lo que les permite desempeñar un papel activo en la degradación de la materia orgánica en sus hábitats naturales [151].

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

(v) La cepa PNM-25 (OTU 7) presenta como vecinos más cercanos a representantes del género *Gordonia* sp. Originalmente los miembros de este género fueron reportados como patógenos oportunistas en humanos. Sin embargo, en los últimos años se ha reportado que la mayoría de los nuevos miembros de este género han sido aislamientos tanto de fuentes terrestres como marinas [152]. Varios miembros de este taxón juegan un rol importante en los procesos de biodegradación y biorremediación por su capacidad para degradar compuestos hidrófobos [153]. Es importante destacar que de acuerdo con el límite actual de la circunscripción de una especie procariota basada en la secuencia del 16S rDNA [154], el aislamiento PNM-25 podría ser una especie nueva, porque el porcentaje de similitud de la secuencia del 16S rDNA con su vecino más cercano es inferior al 98,7%.

Recientemente, la técnica de MALDI-TOF MS se ha utilizado para hacer la identificación preliminar de aislamientos bacterianos provenientes de fuentes ambientales. Esta técnica se basa en el análisis del perfil proteico del microorganismo completo. El grado en la conservación de la masa molecular entre las proteínas, se toma como marcador para encontrar la relación filogenética [155].

El análisis de los 24 aislamientos realizado por MALDI-TOF se muestra en la Figura 2.6 donde se compara con el análisis del 16S rDNA. Los espectros de todas las especies de actinobacterias disponibles en la base de datos MALDI-TOF (BDAL), fueron usados para calcular un corte de referencia que podría ayudarnos a determinar la distancia de similitud que define una especie de actinobacteria. El corte calculado mostró que especies similares se definen por un 70% de similitud (Anexo 2). Los clusters (OTUs) observados para el 16S rDNA guardan concordancia con los agrupamientos generados a través del análisis generado por MALDI-TOF, mostrando en términos generales la robustez de los datos de clasificación obtenidos en este estudio por ambas metodologías.

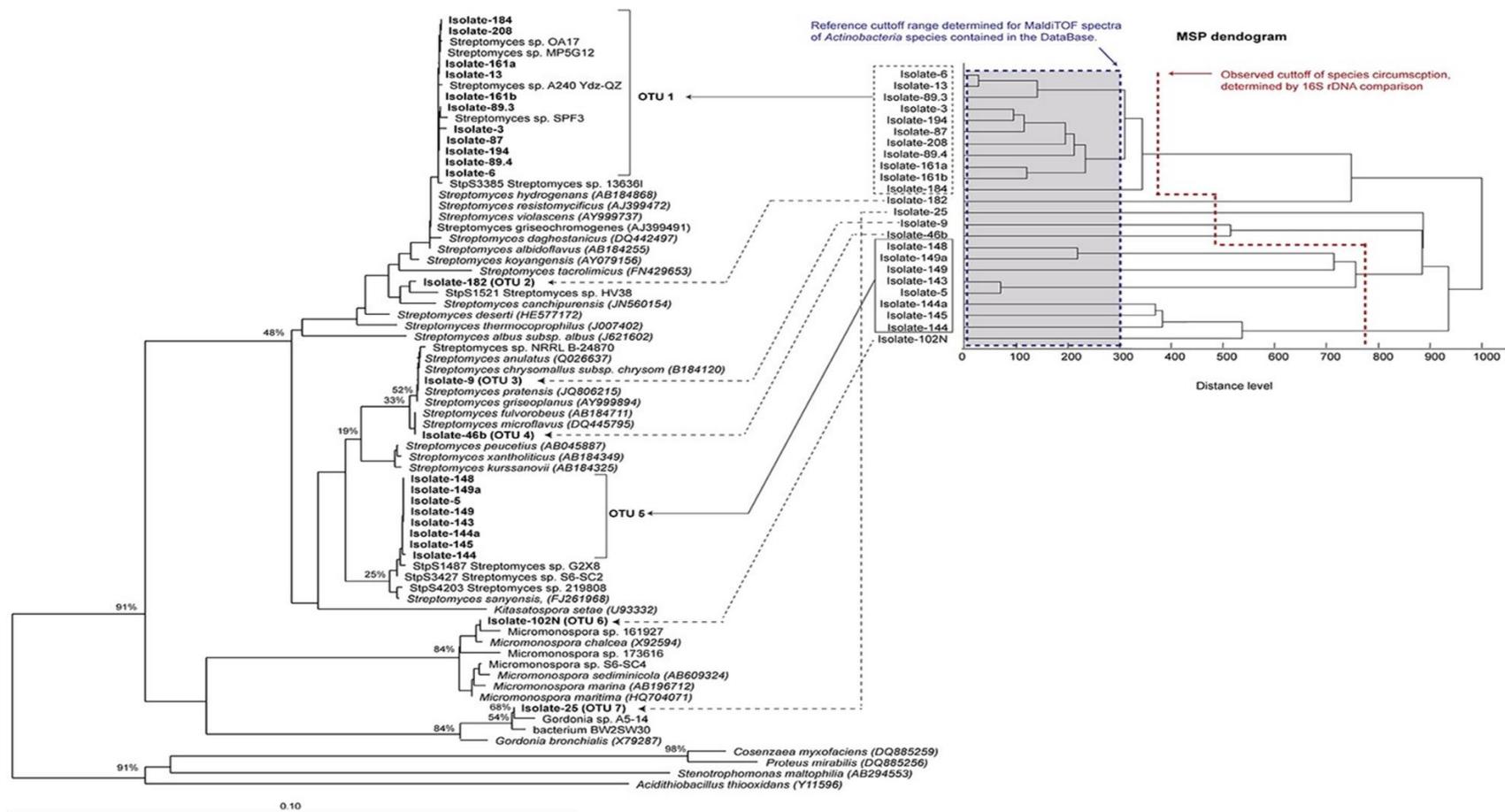


Figura 2.6 Comparación de la reconstrucción filogenética basada en los genes 16SrRNA de las 24 *Actinobacterias* y los clusters generados por el perfil de MALDI-TOF

Estudios previos han reportado que las esponjas marinas, frecuentemente albergan comunidades bacterianas altamente diversas [137], [140], [156], lo cual se confirma con los resultados de nuestro trabajo, donde la muestra de la esponja *Niphates digitalis* produjo el mayor número de cepas de actinobacterias (13). Sin embargo, muestras de las otras esponjas *Xetospongia* sp. (1), *Amphimedon compressa* (0), *Plakortis halichondroides* (0) y *Aplysina archeri* (0) presentaron poca diversidad en cuanto al número de actinobacterias que se lograron recuperar.

Las demás muestras estudiadas también mostraron baja diversidad. De las algas *Dictyota* sp. y *Bryopsis* sp. y del octocoral *Eunicea fusca*, de las cuales se recuperaron dos aislamientos de actinobacterias de cada una de ellas, mientras que de las algas *Codium* sp. y *Amphiroa* sp. sólo se logró recuperar un aislamiento de cada una de ellas. En el caso de las diez muestras de sedimentos estudiados, sólo se lograron recuperar 2 aislamientos de actinobacterias.

En resumen, de las 23 muestras recolectadas de esponjas, octocorales, algas, y sedimentos se logró establecer una colección de 203 microorganismos recuperados de ambientes marinos. De estos 41 corresponden a hongos y 162 son bacterias, de las cuales se lograron recuperar y caracterizar 24 actinobacterias pertenecientes a los géneros *Streptomyces* (22), *Micromonospora* (1) y *Gordonia* (1). Las cepas recuperadas se registraron en el banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá. Teniendo en cuenta que la mayoría de los aislamientos pertenecen al género *Streptomyces*, sería recomendable que para futuros muestreos se pueda combinar el tratamiento de enriquecimiento con carbonato de calcio con otras metodologías que permitan disminuir la flora acompañante y que favorezcan el crecimiento de actinobacterias, incluidos pretratamientos enfocados al enriquecimiento de las muestras en actinobacterias raras.

Esta colección representa una de las pocas que hay en el país especializada en microorganismos de estos ambientes y representa un primer paso para el estudio de los potenciales usos de estos microorganismos, contribuyendo así al incremento del inventario científico de especies y al estudio de la biodiversidad de los ambientes marinos colombianos, una fuente de riqueza poco explorada la cual tiene un enorme potencial para proveer compuestos y enzimas que sirvan de punto de partida para el desarrollo de productos biotecnológicos, con posibles aplicaciones en el campo de la agricultura, entre otros.

Esta colección ha apoyado, además de la realización de este trabajo doctoral, a la realización de una tesis de maestría y otras tres que se encuentran actualmente en desarrollo, así como de 4 trabajos de pregrado, mostrando así la contribución a la generación de conocimiento que se espera de los microorganismos aquí reportados. Así mismo, la colección de actinobacterias obtenida podrá ser evaluada frente a otras dianas biológicas en estudios posteriores. La implementación de las metodologías aquí usadas ha permitido fortalecer la línea de Microbiología Marina del grupo de investigación.

Sin embargo, a pesar de que los datos de la clasificación taxonómica resultan útiles para guiar la selección de muestras, estos datos por sí solos, no nos proporcionan información acerca de la producción metabólica o de la bioactividad de los aislamientos de la colección [157]. Por lo anterior, y para desarrollar criterios de selección de aislamientos con potencial para el control de fitopatógenos, se realizaron los ensayos de actividad biológica que se describen en el siguiente capítulo.

2.3 Conclusiones

Se logró purificar y conservar una colección de 203 microorganismos recolectados en el Caribe Colombiano, a partir de 23 muestras de algas, esponjas, octocorales y sedimentos. Así, se generó una contribución al inventario de especies de nuestro país y al estudio de la biodiversidad de los ambientes marinos colombianos, una fuente de riqueza que hasta ahora se empieza a explotar, con potencial para el desarrollo de productos biotecnológicos.

De esta colección se realizó la caracterización de 24 aislamientos identificados como *Actinobacterias* apoyados en las propiedades morfológicas macroscópicas y microscópicas, pruebas bioquímicas, marcadores quimiotaxonómicos y en la secuenciación del gen 16S rRNA y MALDI-TOF. Los aislamientos caracterizados pertenecen a los géneros *Streptomyces* (22), *Gordonia* (1) y *Micromonospora* (1). De acuerdo con el límite actual de la circunscripción de una especie procariota basada en la secuencia del 16S, el aislamiento PNM-25 podría ser una especie nueva.

2.4 Materiales y métodos

2.4.1 Muestreo de actinobacterias de ambientes marinos

El muestreo fue realizado en el arrecife de la isla de Providencia y Santa Catalina (Mar Caribe colombiano), mediante buceo autónomo SCUBA. Las coordenadas geográficas del área de muestreo estuvieron entre 13°23'0,00"N a 13°25'0.00"N 81°22'0.00"O a 81°24'0,00". El muestreo fue realizado por el Profesor Leonardo Castellanos -de la Universidad Nacional de Colombia) y la Profesora Mónica Puyana (Universidad Jorge Tadeo Lozano). Para llevar a cabo esta recolección, la ANLA (Autoridad Nacional de Licencias Ambientales) y el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, otorgaron el permiso para recolectar y estudiar las muestras de las bacterias recuperadas (Permiso N° 4 de 10/02/2010, Anexo 2, Contrato de Acceso a Recurso Genético No 108, respectivamente).

Con el ánimo de lograr la mayor diversidad posible de actinobacterias de ambientes marinos y apoyados en la información existente en literatura que se presentó previamente, se decidió recuperar microorganismos a partir de diversos tipos de muestras como algas, esponjas, octocorales y sedimentos, las cuales fueron recolectadas por duplicado. Los fragmentos de octocorales y algas fueron recolectados con tijeras, los fragmentos de esponjas con cuchillo de buceo y los sedimentos se recolectaron utilizando cucharas plásticas. Las muestras de organismos vivos fueron fragmentos que no superaron los 2 cm³ y las muestras de sedimentos, fueron del orden de 5 cm³, por lo que este muestreo no causó un efecto negativo en la supervivencia de los individuos muestreados o en el hábitat de estos. La identificación de los organismos de donde se tomaron las muestras de algas e invertebrados la realizó la profesora Mónica Puyana (Universidad Jorge Tadeo Lozano) y se presenta en la Tabla 2.2.

Cada muestra se depositó de forma individual en una pequeña bolsa plástica sellable y se llevó a la superficie. Las muestras se enjuagaron con agua estéril para eliminar contaminantes superficiales y se sembraron por duplicado en cajas de Petri con medio de cultivo sólido estéril ISP-2 (extracto de levadura 4g/L, extracto de malta 10 g/L, dextrosa 4 g/L, agar 20 g/L) y agar avena suplementado con sales (AAs: avena 30 g/L, NaCl 20,8 g/L, KCl 0.56 g/L, MgSO₄ 4.8 g/L, sal marina Rila 1.5 g/L, glicerol 1.5 g/L, agar 18 g/L). Las cajas de Petri con las muestras se

mantuvieron a temperatura ambiente para ser transportadas al laboratorio del grupo en Bogotá por vía aérea.

2.4.2 Aislamiento de los microorganismos

La recuperación de cepas se realizó empleando el procedimiento reportado por el Profesor Luis Ángel Maldonado de la Universidad Metropolitana Autónoma de México, especialista en recuperación e identificación de actinobacterias [133] con algunas modificaciones propuestas por la Dra. Zulma Rocío Suarez (Vecol) [158] las cuales se describen a continuación.

Brevemente, las muestras obtenidas en los medios ISP-2 y AAs, se incubaron a 30°C durante dos semanas. Luego de este tiempo, tanto las muestras como el agar que las contenía se fragmentaron finamente con ayuda de una aguja estéril. El contenido de cada caja se transfirió a tubos para centrifugación estériles de 50 mL. A cada tubo se le adicionó 2.0 mL de solución salina estéril (0.85 % NaCl) y se homogenizaron en un vórtex. Cada tubo se suplementó con 50 mg de CaCO₃ para favorecer el crecimiento de cepas de actinobacterias [67]. Estas suspensiones se incubaron con agitación a 26 °C por 1 semana. Luego, de cada muestra se tomó 1 mL de la suspensión y se prepararon diluciones seriadas desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁵ con solución salina estéril y Tween-80® (0.1%). Finalmente, se hizo un sembrado masivo con 100 µL de las diluciones en medio sólido CSA (casein-starch agar) (caseína 1 g/L, almidón 10 g/L, K₂HPO₄ 0.5 g/L, agar 15 g/L) usando perlas de vidrio estériles. Las cajas se incubaron a 26 °C por un periodo de 4 a 6 semanas intentando observar cepas de crecimiento lento.

2.4.3 Aislamiento en cultivo puro y preservación de las cepas

La purificación de los aislamientos bacterianos se llevó a cabo mediante repiques sucesivos de colonias individuales en medio CSA. En este proceso de purificación se lograron recuperar un total de 203 aislamientos, discriminados en 162 bacterias y 41 hongos. Las bacterias así aisladas se conservaron como se describe a continuación:

i) Para las bacterias que formaron micelio (típicas de organismos similares a las actinobacterias), se cultivaron colonias individuales en placas de CSA a 4°C (conservación a

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

corto plazo) y además, se preservaron suspensiones de micelio con glicerol al 50% a -80 °C (conservación a largo plazo) [159].

ii) Para las bacterias que no presentaban micelio, una única colonia fue crecida en TSA (*Trypticase soy agar*, Difco ®), y un asa llena de biomasa se suspendió en TSB (*Trypticase Soy Broth*) suplementado con glicerol al 30%. Posteriormente se almacenaron en crioviales a -80 °C (conservación a largo plazo).

Las cepas recuperadas en esta investigación fueron registradas en el banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá (IBUN) con los códigos IBUN-090-02027- IBUN-090-02182.

2.4.4 Identificación taxonómica de *Actinobacterias*

De acuerdo con la caracterización microscópica y macroscópica de los aislamientos, se seleccionaron 24 cepas, que basados en sus características morfológicas y de crecimiento se clasificaron de manera preliminar como *Actinobacterias*. A estos aislamientos se les realizaron las pruebas bioquímicas, quimiotaxonómicas y moleculares que se describen a continuación.

2.4.4.1 Caracterización bioquímica

Las colonias individuales de las cepas que tentativamente se clasificaron como *Actinobacterias*, se cultivaron en agar nutritivo, y en los medios de cultivo recomendados por el proyecto internacional de Streptomyces (ISP), agar ISP-2, ISP-3, y agar ISP-4. En cada uno de estos medios, se describió la morfología de sus colonias, la pigmentación tanto en el anverso como en el reverso de la caja de Petri; si se observó o no esporulación en las colonias; y si existió presencia o no de exudados (probablemente metabolitos secundarios). Esta descripción realizada para los 24 aislamientos se encuentra en el Anexo 1.

A los 24 aislamientos se les aplicó el test de la actividad de la catalasa y oxidasa (Bactident ® y Oxidasa MERKC) [160], [161]. Otras características bioquímicas se determinaron empleando el kit API 20E (bioMe®rioux Inc., Durham, NC). Estas pruebas incluyen la fermentación o la oxidación de azúcares (glucosa, manitol, inositol, sorbitol, ramnosa, sacarosa, melibiosa, amigdalina y arabinosa); la actividad enzimática (β -galactosidasa, arginina-dihidrolasa, lisina

descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, ureasa, triptófano-desaminasa, gelatinasa); la utilización de citrato; producción de sulfuro, indol, acetoina y la reducción de nitrato (Tabla 2.1). En cada caso se comparó el resultado con la escala colorimétrica que provee el fabricante con el Kit y con datos descritos para otras actinobacterias [162].

2.4.4.2 Caracterización de ácidos diaminopiméricos

Para realizar una aproximación a la caracterización de los 24 aislamientos de las actinobacterias aisladas apoyados en caracteres quimitaxonómicos, se determinó la presencia del ácido L,L-diaminopimérico (LL-DAP) y del ácido meso-diaminopimérico, en la pared celular, mediante el protocolo establecido por Staneck y Roberts [163] con algunas modificaciones recomendadas por el Profesor Luis Ángel Maldonado [164].

Inicialmente en un tubo de microcentrifuga (Eppendorf) de 2 mL, se suspendieron dos asas con biomasa fresca de cada aislamiento (crecimiento de 7 - 14 días) en 500 µL de HCl 6N. Esta suspensión se homogeneizó en un vórtex durante 10 min y luego se colocó en un horno a 100 °C durante 8 h. Después de la centrifugación a 13.000 rpm, los sobrenadantes se transfirieron a un nuevo tubo Eppendorf y se secaron a 100 °C. A cada tubo se añadieron 500 µL de agua destilada estéril. Las muestras se centrifugaron y se secaron una vez más hasta que los sobrenadantes se secaron completamente. Este material se suspendió en 75 µL de agua destilada.

Para el análisis por TLC, 3 µL de cada muestra y 1 µL del patrón (mezcla de los ácidos diaminopiméricos al 1% en agua destilada, CHEM-IMPEX INT.L INC) se aplicaron sobre placas de TLC de celulosa 20 x 20 cm. Las placas de TLC se desarrollaron en cámaras de vidrio saturadas con metanol-agua-HCl 6N-piridina (80: 26: 4: 10, v/v). Luego de eluidas, las placas se secaron en cabina extractora de vapores, se asperjaron con una solución de ninhidrina preparada al momento de su aplicación (0.2%, p/v disuelta en acetona) y se calentaron a 100°C durante 5 min. La presencia del ácido L,L-diaminopimérico se detectó en aquellas regiones que presentaron un color verde oliva ($R_f = 0.6$).

2.4.4.3 Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM)

Algunas de las cepas seleccionadas para el análisis mediante microscopía electrónica de barrido fueron PNM-5, PNM-9, PNM-161a, PNM-182 y PNM-208, inicialmente se cultivaron durante 8 días en agar ISP-2, usando papel de filtro. Las cepas se fijaron utilizando un buffer fosfato-Milloning (0.1 M, pH 7.2)- Glutaraldehído (1%). Las células se enjuagaron con agua destilada y posteriormente se deshidrataron con etanol. El papel filtro se secó y luego se fijó y se recubrió con grafito. El análisis de microscopía de barrido se realizó utilizando el equipo SEM-Tescan Vega 3 SB, que opera con un filamento de tungsteno a voltajes de aceleración de los electrones desde 200V hasta 30kV [165][166].

2.4.4.4 Identificación basada en caracteres moleculares y MALDI-TOF

La clasificación taxonómica de los 24 aislamientos de *Actinobacterias* que fueron recuperadas en este estudio, se realizó mediante la secuenciación del gen 16S rRNA (gen ribosomal 16S). Para tal efecto, cultivos puros de los 24 aislamientos fueron obtenidos en agar ISP-2 y enviados para secuenciación del gen 16S rRNA. Los cebadores (*primers*) usados para el análisis fueron: 518F (5'-CCAGCAGCCGCGTAATACG-3'), 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3') y 785F (5'-GGATTAGATACCCTGGTA-3'), 907R (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT -3') [167] [47].

Las secuencias parciales obtenidas para cada alineamiento fueron ensambladas con el software CLCbio Mainworkbench 6.9.1 y la secuencia entera del gen 16S rRNA se analizó mediante una búsqueda y comparación de las secuencias alineadas en la plataforma del Ribosomal Data Project (<https://rdp.cme.msu.edu/login/myrdp/logout.spr>) y las bases datos EzTAXON y LTP 109 - SILVA Living Tree Project [168].

Una vez identificados los vecinos más cercanos para cada aislamiento, se descargaron sus secuencias y se construyó un árbol filogenético utilizando el programa MEGA® (Versión 5.2.2.) y el programa ARB [169] empleando el método de Neighbor-joining (Figura 2.4). Todas las secuencias de 16S rRNA para las 24 cepas, fueron depositadas en el GenBank/EMBL/DDBJ bajo los números de acceso KX641378 a KX641401, como se presenta en la Tabla 2.2.

De forma paralela a la identificación mediante la secuenciación del gen 16S rRNA, los aislamientos también fueron identificadas mediante una aproximación por espectrometría de masas usando la técnica MALDI-TOF [170]. Para este propósito, los 24 aislamientos fueron cultivadas en medio LB (Luria Bertani, el cual contiene por litro 5 g de extracto de levadura, 10 g NaCl, 10 g triptosa, ajustando el pH a 7.2 usando NaOH 3N) y se incubaron durante una semana a 28°C.

La identificación se realizó con el método de frotis directo, en donde una sola colonia de cada aislamiento fue depositada como una capa delgada sobre la placa de MALDI y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, la placa de MALDI se cubrió con 1 µL de ácido fórmico al 70% y luego se recubrió con la solución matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico-HCCA) y se secó al aire. Los perfiles proteicos de los 24 aislamientos se visualizaron en el equipo MALDI Biotyper RTC con el software Flex Control (versión 3.0). Los dendrogramas se obtuvieron usando el software BioTyper 3.0. Para la calibración y como control positivo, se utilizó el perfil proteico de *Escherichia coli* (DH5 α) BTS (Bacterial Test Standard) (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania). Esta identificación por MALDI-TOF fue realizada para este trabajo por el profesor Alejandro Acosta (Universidad de la Sabana) en colaboración con la profesora Claudia Parra *Ph.D.* (Pontificia Universidad Javeriana).

3. Evaluación de la actividad contra fitopatógenos de 24 aislamientos de actinobacterias marinas

3.1 Introducción

Colombia al ser un país tropical, se caracteriza por presentar zonas con suelos muy productivos que permiten el establecimiento de diversos tipos de cultivos [1]. Sin embargo, una de las problemáticas que enfrenta el sector agrícola nacional, es la alta incidencia de enfermedades de diferente origen etiológico que afectan el desarrollo de las plantas en etapas tempranas y tardías del cultivo, generando pérdidas significativas en la producción [2]. Tal y como se mencionó en el primer capítulo, la presencia de fitopatógenos en cultivos de importancia económica mundial y los problemas que allí se derivan, han llevado tanto a la industria como a la academia a incrementar sus esfuerzos en la búsqueda de soluciones a esta problemática [3].

Una vez obtenida y caracterizada la colección de actinobacterias recuperadas de ambientes marinos con las que se realizará el presente trabajo se procedió a la evaluación de su actividad in vitro para el control de fitopatógenos. Para la selección de los fitopatógenos en el presente trabajo se tuvo en consideración las siguientes problemáticas:

El cultivo del arroz (*Oryza sativa* Linneo), es considerado uno de los más importantes para la economía mundial, con una producción aproximada de 756.7 millones de toneladas en 2017 [171]. Alrededor del 75% de la producción mundial de este cereal se ve afectada gravemente por la enfermedad denominada añublo bacteriano de la panícula (BPB) [172]. La BPB se caracteriza por generar esterilidad de las espiguillas, decoloración de los granos emergentes, disminución del tamaño del grano, inhibición de la germinación de las semillas y esterilidad de

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

las flores [173] Figura 3.1. Los principales agentes etiológicos de esta enfermedad son las bacterias del género *Burkholderia*, particularmente *B. glumae* y *B. gladioli* [172].

El manejo de la enfermedad se ha tratado de realizar utilizando diferentes estrategias que incluyen el tratamiento químico de las semillas con ácido oxolínico y el uso de semillas certificadas [173]. Sin embargo, estos manejos no han resultado exitosos, puesto que el uso extensivo de pesticidas químicos, ha traído consigo efectos negativos, como la resistencia de los fitopatógenos y la contaminación [173].



Figura 3.1 Añublo bacteriano de la panícula de arroz (BPB) causado por bacterias del género *Burkholderia* sp [174]. La foto de la izquierda muestra una panícula baneada y a la derecha una panicual cargada con granos de arroz.

Otro cultivo de importancia económica para nuestro país es el clavel (*Dianthus caryophyllus* L.), el cual hace parte del gran mercado de las flores en el mundo. Colombia es el segundo exportador mundial de flores después de Holanda y el primero en claveles. Es por ello que el estudio de las enfermedades que llegan a afectar la producción de esta flor reviste particular importancia. Dentro de estas enfermedades, el marchitamiento vascular, ocasionado por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Figura 3.2), que ataca de manera agresiva este cultivo, deja pérdidas anuales significativas de más del 20% de los cultivos a nivel mundial [175], [176].

Para su control se ha implementado un plan integrado de manejo que comprende diversas medidas que evitan la entrada y diseminación del patógeno en los invernaderos. Sin embargo, considerando los costos económicos y el impacto ambiental que conlleva la ejecución de dicho plan, la búsqueda de alternativas como el control biológico del fitopatógeno, constituye en un campo de particular interés para contribuir a mejorar la productividad de este cultivo [175].



Figura 3.2 Marchitamiento vascular en cultivos de *Dianthus caryophyllus* L. causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* marchitamiento en raíz (izquierda), marchitamiento en la corona de la planta (derecha) [177].

Adicionalmente, el cultivo de ñame (*Dioscorea* sp.) engloba especies silvestres y cultivadas originarias de África, Asia y América, las cuales son sembradas en regiones tropicales, subtropicales y templadas de todo el mundo [178]. En promedio, Colombia siembra 340.000 hectáreas, de las cuales se obtienen 385.000 toneladas por año. Este cultivo ha sido afectado por hongos, entre los que se destacan *Fusarium oxysporum*, causante de la marchitez de la planta y *Colletotrichum gloeosporioides* causante de la antracnosis [178].

El hongo *Colletotrichum* es uno de los géneros patógenos de plantas más importantes y de mayor distribución en el mundo ya que ataca especialmente cultivos de regiones tropicales y subtropicales [179]. La antracnosis es una enfermedad que ocasiona lesiones típicas

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

necróticas en los tallos, hojas y frutos de las plantas afectadas [180] (Figura 3.3). Tiene una relevancia notable en la agricultura moderna, no solo porque posee el potencial de destruir el 100% de la cosecha, sino porque aún en los casos en que no causa pérdidas totales, por lo general, reduce en forma crónica el rendimiento del cultivo.

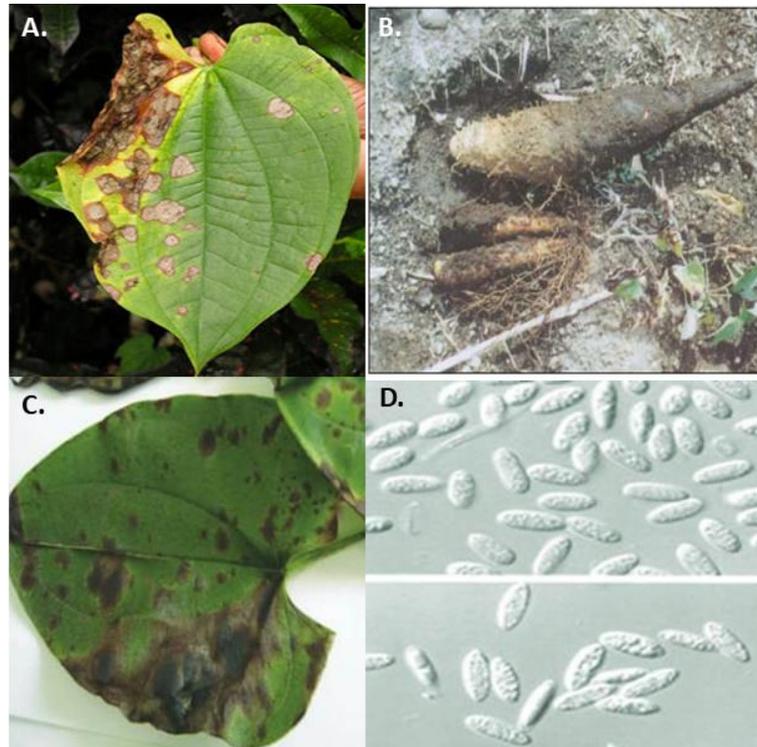


Figura 3.3 Antracnosis causada por *Colletotrichum* sp. en ñame (A y B). Se observan manchas necróticas por antracnosis en hojas de ñame (C) y conidias del hongo *C. gloeosporioides* (D) [181].

El uso tradicional de fungicidas de síntesis química logra un cierto control de la enfermedad. Sin embargo, generan un impacto negativo sobre los organismos benéficos presentes en el ambiente. Por lo anterior, los resultados han sido poco eficientes y lo que se ha logrado es aumentar problemas como la contaminación ambiental, el aumento en los costos de producción y la generación de una respuesta adaptativa del patógeno [182], por lo cual se requieren de nuevas estrategias para su control.

Así, en este capítulo se presentará la evaluación de la actividad biológica de los 24 aislamientos de actinobacterias aisladas e identificadas en el capítulo 2 y como una contribución al establecimiento de su potencial biotecnológico. Para los ensayos de actividad antibacteriana fueron evaluadas tres bacterias del género *Burkholderia*: *Burkholderia plantarii* ATCC 43733, *Burkholderia glumae* ATCC 33617 y *Burkholderia gladioli* 3704-1-FEDEARROZ-. Para los ensayos antifúngicos, fueron evaluados dos hongos fitopatógenos: *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* raza 2 y *Colletotrichum gloeosporioides* 26B.

3.2 Resultados y discusión

Como un criterio de selección de muestras para realizar estudios de la producción de compuestos antimicrobianos, a las cepas de actinobacterias se les evaluó su actividad antibacteriana y antifúngica una vez purificadas, conservadas, e identificadas. Para esto, inicialmente se realizó una prueba de antagonismo (confrontación directa) contra los fitopatógenos bacterianos *Burkholderia glumae* ATCC 33617, *B. gladioli* 3704 -1 y *B. plantarii* ATCC 43733. También se evaluó la actividad antifúngica de los aislamientos contra los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* f. Sp. *dianthi* (clavel) y *Colletotrichum gloeosporioides* 26B (Ñame), cuyos resultados se presentan a continuación.

3.2.1 Resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana mediante enfrentamiento directo:

La actividad antibacteriana fue evaluada mediante enfrentamiento directo. Esta metodología es una de las más utilizadas en ensayos preliminares de actividad antibacterial, ya que permite evaluar la actividad frente a varios patógenos de manera simultánea [183]. En el presente estudio, los aislamientos de actinobacterias fueron sembrados cubriendo un tercio de las cajas de Petri, lo cual permite una mejor difusión de los compuestos producidos en el agar.

En la Figura 3.4 se presentan los resultados de la confrontación directa y de la evaluación de la actividad de los extractos para los 24 aislamientos evaluados. El eje horizontal ilustra los códigos de los aislamientos mientras que el eje vertical muestra cada uno de los patógenos ensayados. La presencia de color en el cuadro indica un resultado positivo (control total o parcial del patógeno). Una fotografía de la evaluación de la actividad antibacteriana por enfrentamiento directo, en este caso de *Streptomyces* sp. PNM-9 contra *Burkholderia* sp. y de

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

la evaluación de la actividad antifúngica de *Streptomyces* sp. PNM-5 contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* raza 2 se presentan en la parte superior de la Figura 3.4.

Todas las 24 cepas seleccionadas presentaron actividad en la prueba de confrontación directa contra al menos uno de los fitopatógenos evaluados. En la confrontación directa contra las tres bacterias fitopatógenas, se encontró que los aislamientos más activos, en términos del número de fitopatógenos controlados, fueron *Streptomyces* sp. PNM-5, *Streptomyces* sp. PNM-9, *Streptomyces* sp. PNM-13, *Streptomyces* sp. PNM- 46b, *Streptomyces* sp. PNM-89.3, *Streptomyces* sp. PNM-161a, *Streptomyces* sp. PNM-182 y *Streptomyces* sp. PNM-208, las cuales controlaron a las tres bacterias en el enfrentamiento directo. Los aislamientos bacterianos más activos contra los dos hongos evaluados en el enfrentamiento directo fueron *Streptomyces* sp. PNM-3, *Streptomyces* sp. PNM-5, *Streptomyces* sp. PNM-13 y *Streptomyces* sp. PNM-161b. De esto se desprende que los aislamientos con más amplio espectro de actividad en el enfrentamiento directo fueron *Streptomyces* sp. PNM-5 y *Streptomyces* sp. PNM-13.

Por otro lado, la cepa que presentó menor actividad fue *Gordonia* sp. PNM-25 dado que sólo controló a *B. gladioli*. También se observó un perfil con poca actividad en *Micromonospora* sp. PNM-102N, *Streptomyces* sp-PNM-144 y *Streptomyces* sp-PNM-149

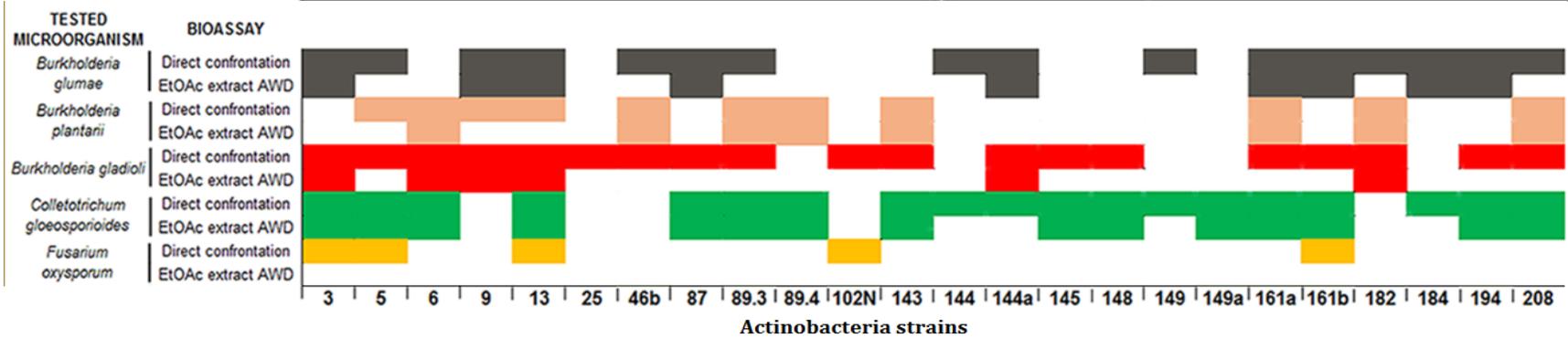
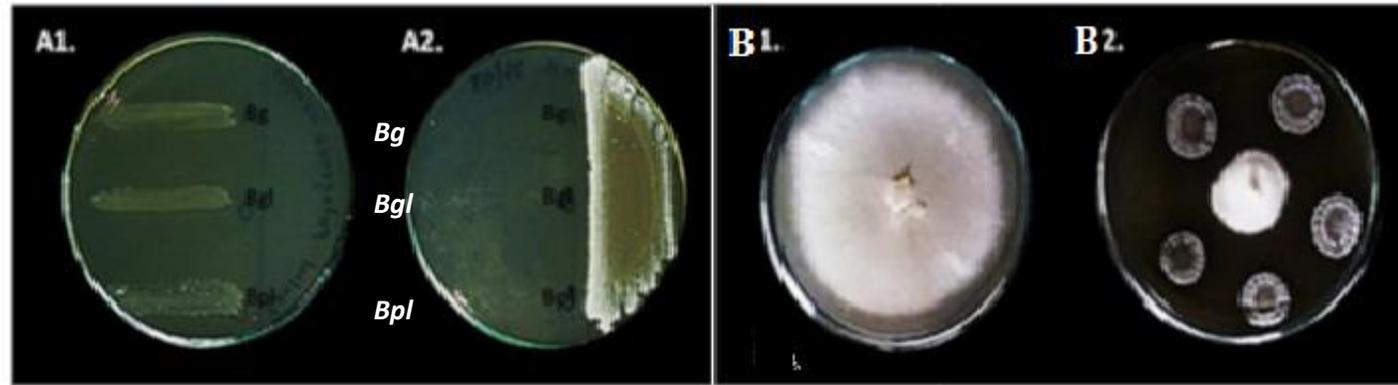


Figura 3.4 Resultado de los ensayos de actividad por enfrentamiento directo y de los extractos de las 24 cepas de actinobacterias. (A, B) Enfrentamiento directo de las 24 actinobacterias Vs los 5 patógenos. En la parte superior se observan las fotografías A1: Control del crecimiento de las bacterias fitopatógenas. A2: Actividad antibacteriana de la bacteria *Streptomyces* sp. PNM-9. B1. Control del crecimiento del hongo *F. oxysporum* f. *sp dianthi* raza 2. B2. Actividad antifúngica de la bacteria *Streptomyces* sp. PNM-5. Actividad de los extractos orgánicos de las 24 cepas. El eje horizontal ilustra los códigos de las 24 Actinobacterias. En la figura el eje vertical muestra cada uno de los patógenos ensayados. La presencia de color en el cuadro indica un resultado positivo (control total o parcial del patógeno).

3.2.2 Resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos de las 24 cepas:

Los resultados de la evaluación de la actividad de los extractos orgánicos en AcOEt de las 24 cepas se resumen en la Figura 3.4. Una fotografía de los resultados obtenidos se presenta en el Anexo 3. Algunas de las cepas mantuvieron su actividad al evaluar su extracto orgánico, como se puede observar en la segunda fila de cada una de las evaluaciones realizadas.

Varios de los extractos mantuvieron la actividad observada en las pruebas de confrontación directa contra *B. plantarii* donde ocho de los once aislamientos que eran activos en el enfrentamiento directo mantuvieron su actividad en el extracto (8/11). De manera análoga 15 de los 19 aislamientos activos en el enfrentamiento directo contra *C. gloeosporioides* mantuvieron su actividad en el extracto orgánico (15/19). Otros aislamientos mostraron menor actividad o la pérdida de la actividad en el extracto orgánico al ser enfrentados contra *B. glumae* (9/16), *B. gladioli* (6/19) y *F. oxysporum* (0/5). Esto indica que los fitopatógenos *B. plantarii* y *C. gloeosporioides* mostraron ser más susceptibles a ser controlados por los extractos orgánicos de varios de los aislamientos. Esto sugiere también que el control del crecimiento de los fitopatógenos que se observó en el enfrentamiento directo y que se mantuvo en el extracto orgánico se realizó mediante la producción de metabolitos secundarios, debido al tipo de extracto empleado en esta prueba.

En el ensayo de actividad de los extractos orgánicos, uno de los aislamientos más activos fue el obtenido de *Streptomyces* sp. PNM-161a. Este aislamiento presentó actividad en los ensayos de confrontación directa contra las tres bacterias y contra el hongo *C. gloeosporioides*. Su extracto orgánico conserva la actividad contra tres de los cuatro fitopatógenos y perdió la actividad contra *B. gladioli*.

Otros aislamientos de interés por su espectro de actividad fueron *Streptomyces* sp. PNM-6, *Streptomyces* sp. PNM-3 y *Streptomyces* sp. PNM-13, los cuales controlaron a 3 de los 5 fitopatógenos patógenos evaluados. Es de resaltar que el extracto orgánico de *Streptomyces* sp. PNM-5 solo controló a *C. gloeosporioides*, perdiendo su capacidad de controlar a las bacterias fitopatógenas evaluadas.

3.2.3 Resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos acuosos de las 24 cepas

Un análisis similar al realizado con los extractos orgánicos se llevó a cabo con los extractos acuosos obtenidos de los 24 aislamientos de actinobacterias. Como se ilustra en la Figura 3.5, gran parte de los extractos acuosos mantuvieron la misma actividad antibacteriana observada en las pruebas de confrontación directa contra *B. glumae* (12/16) y contra *B. gladioli* (14/19). Otros extractos mostraron menor o ninguna actividad antibacteriana contra *B. plantarii* (3/11). En pocos casos se observó que el extracto acuoso controlara los hongos fitopatógenos *C. gloeosporioides* (5/19) y *F. oxysporum* (0/5). Una fotografía de los resultados obtenidos se presenta en el Anexo 3.

Los extractos acuosos con el mayor espectro de actividad fueron los obtenidos de *Streptomyces* sp. PNM-87, *Streptomyces* sp. PNM-89.3 y *Streptomyces* sp. PNM-208 que lograron controlar 3 de los 5 patógenos ensayados. Los extractos de ocho cepas fueron activos contra dos patógenos: *Streptomyces* sp. PNM-6, *Streptomyces* sp. PNM-13, *Streptomyces* sp. PNM-46b, *Streptomyces* sp. PNM-89.4, *Streptomyces* sp. PNM-144, *Streptomyces* sp. PNM-161a, *Streptomyces* sp. PNM-161b y *Streptomyces* sp. PNM-194. Finalmente, los extractos acuosos de *Streptomyces* sp. PNM-3, *Streptomyces* sp. PNM-144a, *Streptomyces* sp. PNM-149a y *Streptomyces* sp. PNM-184, no mostraron actividad frente a los patógenos evaluados.

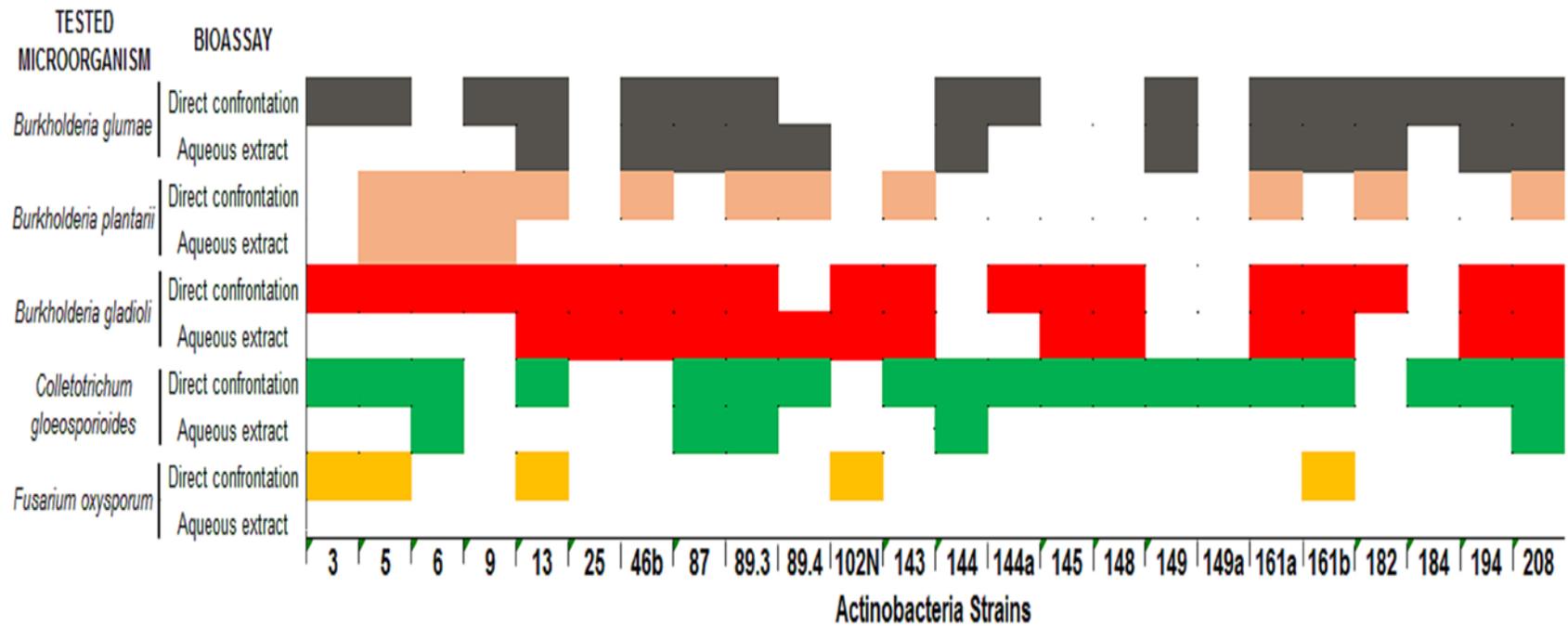


Figura 3.5 Resumen de los ensayos de actividad de los extractos acuosos de las 24 cepas de actinobacterias.

El eje horizontal ilustra los códigos de las 24 actinobacterias. El eje vertical muestra cada uno de los patógenos ensayados. La presencia de color en el cuadro indica un resultado positivo (control total o parcial del patógeno)

En la evaluación de la actividad antimicrobiana de las cepas, se encontraron algunos aislamientos con amplio espectro de actividad versus aislamientos con alta especificidad contra los fitopatógenos ensayados.

Por ejemplo, para ilustrar el primer caso, se encontró que la cepa *Streptomyces* sp. PNM-161a logró controlar 4 de los 5 fitopatógenos en el ensayo de confrontación directa y su extracto orgánico se mantiene activo contra *B. glumae*, *B. plantarii* y *C. gloeosporioides* mientras que su extracto acuoso fue activo contra *B. gladioli* y también contra *B. glumae*.

Un caso similar se presenta en la cepa *Streptomyces* sp. PNM-208. Al igual que la anterior, en el ensayo de confrontación directa logró controlar 4 de los 5 fitopatógenos. Su extracto orgánico fue activo contra *B. plantarii* y *C. gloeosporioides* y su extracto acuoso fue activo contra *B. glumae*, *B. gladioli* y también contra *C. gloeosporioides*.

Los aislamientos *Streptomyces* sp. PNM-9 y *Streptomyces* sp. PNM-182 en el ensayo de confrontación directa tuvieron control selectivo contra las tres bacterias fitopatógenas. Para el caso de *Streptomyces* sp. PNM-9 su extracto orgánico controló a *B. glumae* y *B. gladioli* y su extracto acuoso controló a *B. plantarii*.

En el caso de *Streptomyces* sp. PNM-182 su extracto orgánico logró controlar a *B. gladioli* y *B. plantarii* mientras que su extracto acuoso controló *B. glumae*, sugiriendo la necesidad de caracterizar la composición química observada tanto en el extracto orgánico como en el acuoso para así determinar en cada uno de los casos cuales podrían ser los compuestos activos.

El hecho de que algunos de los extractos de cepas que mostraron actividad en los ensayos de antagonismo pierdan la actividad (por ejemplo, *Streptomyces* PNM-05) sugiere que el efecto antagónico observado podría deberse a otros mecanismos de control diferentes a la producción de metabolitos secundarios. Uno de esos mecanismos es la producción de enzimas hidrolíticas que pueden degradar la pared celular de hongos y bacterias, la membrana celular, las proteínas de membrana y los factores de virulencia que están implicados en el control biológico de los fitopatógenos. Estas enzimas hidrolíticas incluyen entre otras, la quitinasa, celulasa, glucanasa, proteasa, fosfolipasa, pectinasa y peroxidasa [3], [184], [185], las cuales han sido ampliamente documentados en literatura especializada [186]–[188]. Este tipo de

moléculas ven comprometida su estabilidad química (cambios estructurales o degradaciones) cuando se encuentran en condiciones de extracción que no regula el pH o que usan solventes orgánicos [189], [190].

Tradicionalmente, el proceso de selección de cepas con las cuales continuar sus estudios químicos, tenía en cuenta únicamente los resultados del screening de bioactividad. Sin embargo, estos datos por sí solos, no nos brindan información sobre los compuestos responsables de la actividad biológica. Por lo anterior, en este trabajo se decidió evaluar el perfil metabólico de los extractos como un tercer factor para la priorización de las cepas para su estudio químico con el fin de generar mejores criterios para la selección de cepas productoras de compuestos activos y preferiblemente novedosos para su aislamiento y elucidación estructural.

3.3 Conclusiones

En este capítulo se evaluó una colección de 24 actinobacterias aisladas de ambientes marinos del Caribe Colombiano, como fuente de compuestos con actividad antibacteriana y antifúngica, como una primera aproximación a establecer el potencial biotecnológico de estos aislamientos marinos para su uso en el control de fitopatógenos.

Las 24 actinobacterias seleccionadas presentaron actividad en la prueba de confrontación directa contra al menos uno de los fitopatógenos evaluados y algunas de las cepas mantuvieron su actividad al evaluar sus extractos orgánicos o acuosos sugiriendo que el control del crecimiento de los fitopatógenos en esos casos se realizó mediante la producción de metabolitos secundarios.

En términos del espectro de actividad de los extractos orgánicos, se encontró que *Streptomyces* sp. PNM-161a presentó actividad en tres de los cinco ensayos, mientras que otros aislamientos mostraron tener un menor espectro de actividad antimicrobiana al controlar dos o uno de los fitopatógenos.

Los extractos acuosos de los aislamientos de *Streptomyces* sp. PNM-87, *Streptomyces* sp. PNM-89.3 y *Streptomyces* sp. PNM-208, mostraron los mejores espectros de actividad al controlar tres de los cinco fitopatógenos ensayados.

También se detectó la presencia de extractos con alta selectividad hacia uno solo de los fitopatógenos ensayados, como es el caso del extracto orgánico de *Streptomyces* sp. PNM-5, siendo esta otra alternativa de interés para la selección de extractos para su estudio químico biodirigido.

3.4 Materiales y métodos

3.4.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias marinas contra fitopatógenos

3.4.1.1 Cepas de los fitopatógenos

Las bacterias fitopatógenas seleccionadas *Burkholderia plantarii* ATCC 43733, *Burkholderia glumae* ATCC 33617, y *Burkholderia gladioli* CIAT 3704-1, fueron gentilmente suministrados por FEDEARROZ los cuales se aislaron a partir de plantas de arroz sintomáticas de BPB. Para los ensayos antifúngicos, fueron seleccionados dos hongos fitopatógenos: *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* raza 2, cepa patógena del clavel aislada de plantas sintomáticas de marchitez vascular, la cual fue gentilmente facilitada por el grupo de investigación Estudio de Actividades Metabólicas Vegetales, (Departamento de Química -Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá), y la cepa *Colletotrichum gloeosporioides* 26B patógeno del ñame obtenido de plantas con síntomas clásicos de antracnosis, la cual fue facilitada por el Grupo de Investigación sobre el cultivo de Ñame (Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá).

3.4.1.2 Ensayos antimicrobianos

La actividad antibacteriana y antifúngica de los 24 aislamientos fue determinada en primera instancia por el método de difusión en placa mediante ensayos de confrontación directa [191]. Los 24 aislamientos se recuperaron de su stock de glicerol y se cultivaron en cajas de Petri en medio ISP-2 y se incubaron a 28 °C.

Las colonias individuales de *Burkholderia* spp. se cultivaron a 30°C en medio líquido KB (peptona 20 g, MgSO₄ 1.5 g, K₂HPO₄ 1.5 g, glicerol 10 mL) antes de su uso [192], [193]. El ensayo de confrontación se realizó de la siguiente manera: las colonias individuales de cada uno de los

aislamientos se sembraron en cajas de Petri que contenían agar MH (Mueller-Hinton Conda ®). El estriado de las actinobacterias se realizó cubriendo la mitad de la superficie del agar. Las cajas se incubaron a 28°C durante un periodo de 10 días. Posteriormente, cada uno de las tres cepas fitopatógenas de *Burkholderia* spp. se sembraron en una línea horizontal, perpendicular a la zona de crecimiento de las actinobacterias (por duplicado). Las cajas se incubaron a 37°C y el crecimiento de las bacterias fitopatógenas se monitoreo diariamente a las 24, 48 y 72 horas. En la lectura del ensayo se realizó una comparación con los controles (cultivos en los cuales únicamente se encontraban las bacterias fitopatógenas) y aquellos aislamientos capaces de inducir la inhibición total o parcial del crecimiento de los patógenos después de 48 horas, se consideraron como positivos para la actividad antibacteriana (Figura 3.4 A1 y A2).

La evaluación de la actividad antifúngica de los 24 aislamientos contra los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* raza 2, y *Colletotrichum gloeosporioides* 26B, se realizó por el procedimiento descrito por Kanini *et al.* con algunas modificaciones [194]. Brevemente, los aislamientos de actinobacterias se sembraron por duplicado en cajas de Petri empleando agar MH. En un criovial y con ayuda de un asa se resuspendió una pequeña cantidad de esporas de cada actinobacteria en 50 µL de H₂O destilada estéril. Se tomaron 7 µL de esta suspensión y se realizaron 5 siembras en la caja de petri que contiene el agar MH. Las cajas se incubaron a 28°C durante 4 días antes de enfrentarlos contra los hongos fitopatógenos. Transcurrido este tiempo, un plug de cada hongo fitopatógeno es inoculado en el centro de la caja de Petri y se incubaron nuevamente a 28°C. El ensayo fue leído cada semana durante 4 semanas, por inspección visual. En la lectura del ensayo se realizó una comparación con los controles (cultivos en los cuales se encontraba únicamente el hongo fitopatógeno) y se seleccionaron aquellas cepas con las mayores inhibiciones de crecimiento de los hongos fitopatógenos como las cepas más activas (Figura 3.4 B1 y B2).

3.4.1.3 Obtención del extracto orgánico y acuoso del cultivo de actinobacterias

Los 24 aislamientos se recuperaron de su stock de glicerol, se cultivaron en cajas de Petri en medio ISP-2 y se incubaron a 28 °C. Posteriormente, las cepas se cultivaron por triplicado en

100 mL de medio de cultivo líquido TSB (Bacto TM BD) en un erlenmeyer de 500 mL, con agitación a 130 rpm, a 25°C durante 15 días. Los cultivos se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 minutos y se filtraron para remover la biomasa. El sobrenadante se extrajo tres veces con acetato de etilo (AcOEt) en proporción 1:1 con el sobrenadante, resultando dos fases. La fase acuosa se congeló y posteriormente se liofilizó para obtener el extracto acuoso. Los extractos orgánicos se concentraron a presión reducida en un rotavapor y se mantuvieron congelados hasta su uso en el screening de actividad antimicrobiana y para el perfilado metabólico (capítulo 4). Para los bioensayos se utilizaron como blancos los extractos acuosos y de AcOEt del medio de cultivo TSB tratado en las mismas condiciones de agitación, volumen de cultivo y tiempo de cultivo.

3.4.1.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de actinobacterias

Actividad antibacteriana de los extractos:

La actividad antibacteriana de los extractos orgánicos y acuosos fue evaluada contra las tres cepas fitopatógenas de *Burkholderia* spp. mediante el método de difusión en agar con algunas modificaciones [195]. Las colonias individuales de *Burkholderia* spp. se cultivaron a 30°C en medio líquido KB antes de su uso. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pozos, adicionando 200 µL de agar KB, 30 µL de inóculo de bacteria (las bacterias se cultivaron en medio líquido KB por 24 horas y su densidad óptica se ajustó a 0.5 para el ensayo), y 30 µL del extracto a ensayar (cada muestra se ensayó por triplicado, donde se pesaron 1.5 mg de cada uno de los extractos tanto orgánicos como acuosos y se resuspendieron para el caso de los extractos de AcOEt en 90 µL de DMSO al 5% y para los acuosos en 90 µL de H₂O destilada estéril; de tal manera, que la cantidad de extracto que se dispensó en cada pozo fue de 500 µg/pozo).

Las cajas de 96 pozos se incubaron de forma estática durante 24 h a 37°C. Posteriormente, se realizó el monitoreo del ensayo mediante inspección visual del crecimiento de cada cultivo de *Burkholderia* spp. Aquellos pozos que mostraron inhibición del crecimiento de *Burkholderia* spp. se consideraron positivos para la presencia de compuestos antibacterianos. Como control positivo para la inhibición bacteriana se utilizó Gentamicina 0,2 µg/pozo, y como controles negativos DMSO al 5% y el medio de cultivo (TSB).

Actividad antifúngica de los extractos:

La evaluación de la actividad antifúngica también se determinó usando los extractos de AcOEt y acuosos obtenidos de cada uno de los 24 aislamientos de actinobacterias, según la metodología descrita por Kanini et al [18]. Brevemente, cada uno de los hongos fitopatógenos se inoculó en cajas de Petri en agar PDA (Scharlau ®) y se incubó a 26 °C. Una vez formado el micelio se preparó una suspensión de conidios con una solución de NaCl al 0.85%. Para el ensayo se usaron cajas de 24 pozos.

La suspensión de conidios fue empleada para embeber un hisopo de algodón estéril, y este se utilizó para diseminar los conidios en la superficie de cada uno de los pozos los cuales contenían 2 mL de PDA. Con un sacabocados se realizó un orificio en el centro de cada pozo. 30 µL del extracto a ensayar se dispensaron en el pozo interno. Cada muestra se ensayó por duplicado, donde se pesaron 1.0 mg de cada uno de los extractos tanto orgánicos como acuosos y se resuspendieron para el caso de los extractos AcOEt en 60 µL de DMSO al 5% y para los acuosos en 60 µL de H₂O destilada estéril; de tal manera, que la cantidad de extracto que se dispensó en cada pozo fue de 500 µg/pozo. Posteriormente las cajas de 24 pozos se incubaron a 26 °C durante 96 h. La inhibición total o parcial del crecimiento del hongo fitopatógeno, se consideró positiva para la presencia de compuestos antifúngicos en los extractos de AcOEt y acuosos. Como control positivo se utilizó una solución de Clotrimazol al 1% (5 µL/ pozo), y como controles negativos DMSO al 5% y el medio de cultivo (TSB).

4. Integración del perfilado metabólico, la taxonomía y la bioactividad para la selección de actinobacterias como fuente de compuestos para el control de fitopatógenos

4.1 Introducción

En los dos capítulos anteriores se presentaron los resultados de la identificación taxonómica de 24 aislamientos identificados como actinobacterias, así como la evaluación de la actividad antimicrobiana contra cinco fitopatógenos de cultivos de arroz, clavel y ñame. En este capítulo se presentarán los resultados de la aplicación de técnicas metabólicas, como el perfilado metabólico para evaluar la producción de compuestos de los 24 aislamientos de actinobacterias previamente estudiados. Además, se presentará una propuesta de integración de la información metabólica, taxonómica y de actividad biológica que permita generar criterios de selección de algunos de los aislamientos para la búsqueda de compuestos novedosos para el control de fitopatógenos.

Recientemente, la bioprospección de cepas microbianas para tratar de aislar nuevos compuestos bioactivos ha dado un giro hacia la implementación de lo que llamaremos estrategias integradas, las cuales combinan datos filogenéticos y pruebas de bioactividad, con datos del perfilado metabólico y derreplicación de las cepas bacterianas, como una alternativa rápida para identificar en mezcla metabolitos bioactivos ya conocidos [12], [13]. Estos nuevos enfoques, junto con análisis multivariados (PCA, HCA, OPLS y otros), han demostrado ser eficaces para lograr la rápida identificación de compuestos con actividad biológica desde el análisis de los extractos, lo que es utilizado como herramienta para seleccionar aquellos microorganismos con los cuales continuar los estudios químicos que permitan el aislamiento y

la elucidación de los compuestos preferiblemente novedosos y que podrían ser los responsables de la actividad biológica observada en los extractos [14], [15].

La metabolómica se define como "la medición de la respuesta metabólica multiparamétrica de los sistemas vivos a estímulos fisiopatológicos o modificaciones genéticas" [196]. Tal definición implica buscar una explicación a nivel molecular de todas las respuestas genómicas, transcripómicas y proteómicas de un organismo a un determinado estímulo o cambio [197]. El objetivo final de la metabolómica es lograr la caracterización química de un fenotipo a través del análisis cualitativo y cuantitativo de todos los metabolitos de bajo peso molecular en un organismo (<1500 Da) y la medición del cambio en el perfil metabólico debido a algún tipo de perturbación [198]. La metabolómica se ha empleado como herramienta para identificar biomarcadores de enfermedades [199] o para ayudar en el proceso de descubrimiento de fármacos a partir de plantas y microorganismos, entre muchas otras aplicaciones como en la ciencia de alimentos, la medicina y la ecología [14], [200]–[203].

Sin embargo, los experimentos de metabolómica enfrentan dificultades, como la complejidad de las muestras a analizar que difiere enormemente dependiendo del organismo que se esté estudiando y pueden variar desde cientos a miles de compuestos [204]; la disponibilidad limitada de bases de datos completas del metaboloma humano o de los metabolomas de otros organismos [205]; la falta de espectros de RMN o MS de referencia para todos los metabolitos conocidos, lo cual hace que la identificación adecuada de los metabolitos se convierta en un reto para el experimentador [206]; la diversidad de las propiedades químicas y físicas de los compuestos en un metaboloma, lo cual hace que aplicar la metabolómica estrictamente como se define (cuantificación simultánea de todos los metabolitos) sea casi inalcanzable con las capacidades instrumentales actuales [196], [204]. Una única técnica analítica no permite visualizar el metaboloma completo, por lo que es necesario usar combinaciones de las diferentes técnicas para obtener una visión global del sistema de estudio.

Dentro de los tipos de análisis metabolómicos, el perfilado metabólico constituye una herramienta que proporciona información relevante sobre el estado del sistema en un momento particular y permite la evaluación cuantitativa y cualitativa de un subconjunto específico de metabolitos secundarios [207], [208]. El perfilado metabólico basado en técnicas

como la resonancia magnética nuclear (NMR) y la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) han mostrado ser útiles en la identificación de nuevos productos naturales antimicrobianos a partir de fuentes microbianas [12].

La cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a detectores selectivos de masas (HPLC-MS) permite el análisis de gran variedad de metabolitos no volátiles en un amplio rango de polaridad [209], razón por la cual es usada en estudios de perfilado metabólico dada su alta sensibilidad (límite de detección=1 pmol/L) y que permite la identificación de compuestos con alto grado de confianza basados en espectros de alta resolución por medio de la determinación del peso molecular, patrones de fragmentación, relaciones isotópicas y/o tiempos de retención [210].

La información obtenida en el espectro junto con el uso de bases de datos permite avanzar en el proceso de identificación. Muchos grupos de investigación han reconocido que la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, es una herramienta fundamental cuando se tiene como objetivo examinar la diversidad química asociada con la producción de metabolitos secundarios a partir de cultivos de colecciones de microorganismos [211]. Por tanto, esta técnica se utiliza frecuentemente en programas de descubrimiento de productos naturales, los cuales tienen como principal objetivo la identificación de moléculas tanto conocidas (por medio de la derreplicación) como desconocidas, a partir de extractos complejos [197], [212].

Luego de obtener los datos crudos a partir de las plataformas analíticas antes mencionadas, éstos deben ser pre-tratados por medio de software especializados (por ejemplo *Mzmine* o software de los fabricantes de equipos), lo que permite la construcción de una matriz de datos, en la cual cada variable corresponde a un compuesto de la muestra (identificado por el ion molecular protonado $[M+H]^+$ y su tiempo de retención) y posteriormente ésta matriz se somete a un análisis estadístico multivariado en paquetes estadísticos especializados como SIMCA-P, R, Labmat entre otros. Los métodos de análisis multivariado han sido de mucha ayuda en la simplificación y extracción de información a partir de los datos. Es frecuente el uso de estos métodos para tratar de identificar los compuestos o variables que permitan inferir algún tipo de relación biológica. Los métodos de análisis multivariado más comúnmente empleados se pueden dividir en dos grandes grupos: no supervisados (análisis de

componentes principales PCA y análisis jerárquico de cluster HCA) y supervisados (PLS y OPLS-DA). La diferencia entre estos dos análisis es que en el segundo se utiliza un grupo de datos con los cuales se “entrena” el algoritmo, para realizar este “entrenamiento” es necesario tener información previa acerca de las muestras que se están analizando [213]–[215].

A la par que se realizan estos análisis multivariados se pueden llevar a cabo procesos de derreplicación a través de bases de datos especializadas [216]. La derreplicación, es una técnica que permite la identificación temprana de compuestos ya reportados sin la inversión tradicional de tiempo y recursos en su aislamiento y elucidación estructural. Esto se logra a través de la comparación de datos espectroscópicos de los compuestos obtenidos a partir del extracto o fracciones crudas, con los datos de compuestos conocidos reportados en bases de datos especializadas [14]. Entre las bases de datos más reconocidas, algunas de ellas de libre acceso, se encuentran AntiMarin, AntiBase, Dictionary of Natural Products, MarinLit, Scifinder, Chempider entre otras.

Tradicionalmente, los procesos de derreplicación más comunes han empleado GC-MS, LC-MS, LC-MS/MS y LC-NMR o combinaciones de ellas. Dentro de estas, los métodos de derreplicación que se basan en el uso de LC-MS y LC-MS/MS han mostrado ser muy sensibles y proveen información estructural (masa molecular de baja o de alta resolución, fórmula molecular), las cuales se pueden utilizar para realizar las búsquedas en la mayoría de las bases de datos comerciales [217], [218].

En este capítulo se presentan los resultados del perfilado metabólico realizado por HPLC-MS a los 24 extractos orgánicos de los aislamientos de actinobacterias caracterizados en el capítulo 2. Posteriormente se presenta una estrategia que integra la información obtenida, permitiendo la priorización de algunos de los aislamientos para la posterior caracterización de la composición química de los extractos orgánicos de algunos de los aislamientos seleccionados, lo cual será presentado en los capítulos 5-7 del presente escrito.

4.2 Resultados y discusión

4.2.1 Evaluación de la producción metabólica de los extractos orgánicos de los 24 aislamientos marinos

Uno de los objetivos principales de este estudio fue la selección de cepas que mostraran diferencias en su producción metabólica y su relación con la actividad antimicrobiana contra fitopatógenos, y de ser posible, con la diversidad biológica de la colección de actinobacterias descrita en el capítulo 2. Con este objetivo, se decidió realizar el estudio de los compuestos presentes en el extracto de acetato de etilo por medio de una estrategia conocida como “*metabolic footprinting*”, una herramienta metabolómica que se basa en el análisis de los metabolitos extracelulares liberados al ambiente por un organismo, sin la necesidad de realizar la identificación de los compuestos presentes en este exometaboloma. La comparación de estas huellas metabólicas usualmente describe tendencias de similitud o diferencias que permiten agrupaciones y que son descritas por unos cuantos compuestos llamados variables [219].

Por medio de métodos de análisis multivariado, algunas de las variables más importantes pueden ser correlacionadas con la actividad biológica, permitiendo proponer cuales de los compuestos de un extracto podrían ser los responsables de la actividad biológica observada desde el extracto crudo, permitiendo así guiar el proceso de aislamiento y elucidación estructural. Esta herramienta es comúnmente usada en estudios de diversidad metabólica, biología sintética y producción biotecnológica aplicada a microorganismos [219]. Con el fin de aplicar esta herramienta, se llevó a cabo el análisis por LC-MS de los 24 extractos orgánicos de las cepas de *Actinobacterias*. Posteriormente, los datos se exportaron a una matriz Excel (.CSV) y se procesaron en el software libre *MZmine* 2.10.

Para el análisis multivariado, se utilizó el paquete estadístico SIMCA-P 14. Para los datos de todos los 24 extractos de AcOEt, incluido el extracto del medio de cultivo (TSB), se realizó un análisis jerárquico de clústers (HCA), el cual se presenta en la Figura 4.1. Los parámetros usados para estos análisis son descritos en la metodología.

El dendrograma (HCA) muestra que los extractos de las cepas se agruparon en ocho clústers diferentes (I a VIII) de acuerdo con su perfil químico por LC-MS. La mayor distancia observada

permite definir al clúster I conformado únicamente por la cepa PNM-208. Esta distancia sugiere que existen diferencias grandes en el perfil metabólico del extracto orgánico de esta cepa con respecto a los otros extractos y al blanco de medio (TSB), lo cual resulta de interés en este tipo de trabajos, en los que se buscan aislamientos con alta diversidad metabólica.

El clúster V conformado por las cepas (PNM-6 y PNM-149), el clúster VI (PNM-5 y PNM-149a), el clúster VII (PNM-143, PNM-144, PNM-144a y PNM-148) y el clúster VIII (PNM-3, PNM-13, PNM-25, PNM-89.3, PNM-145, PNM-161a, PNM-161b y PNM-182) agrupan extractos con grandes diferencias con respecto al medio de cultivo (TSB); mientras que los clúster II, conformado por las cepas (PNM-184), el clúster III (PNM-87 y PNM-89a) y el clúster IV (PNM-9, PNM-46b, PNM-102N y PNM-194), muestran una agrupación de los extractos con mayor similitud al TSB.

En un HCA, la distancia medida de dos objetos corresponde al grado de similitud entre ellos. Así, una distancia pequeña entre los agrupamientos indica una alta similitud entre los perfiles metabólicos de los extractos, en tanto que el aumento en la distancia, indica una mayor diferencia entre los perfiles metabólicos observados. Sin embargo, estas diferencias no deben ser interpretadas directamente como un indicador de mayor o menor diversidad metabólica, ni tampoco como un indicador de novedad en las estructuras de los compuestos presentes en cada extracto.

Como una primera aproximación a la integración de la información metabólica con la información genética presentada en el capítulo 2, se puede observar que la cepa *Streptomyces* sp. PNM-208 la cual mostró una alta similitud con la secuencia de otros aislamientos del OTU 1, puede tener clústers biosintéticos altamente específicos de este aislamiento.

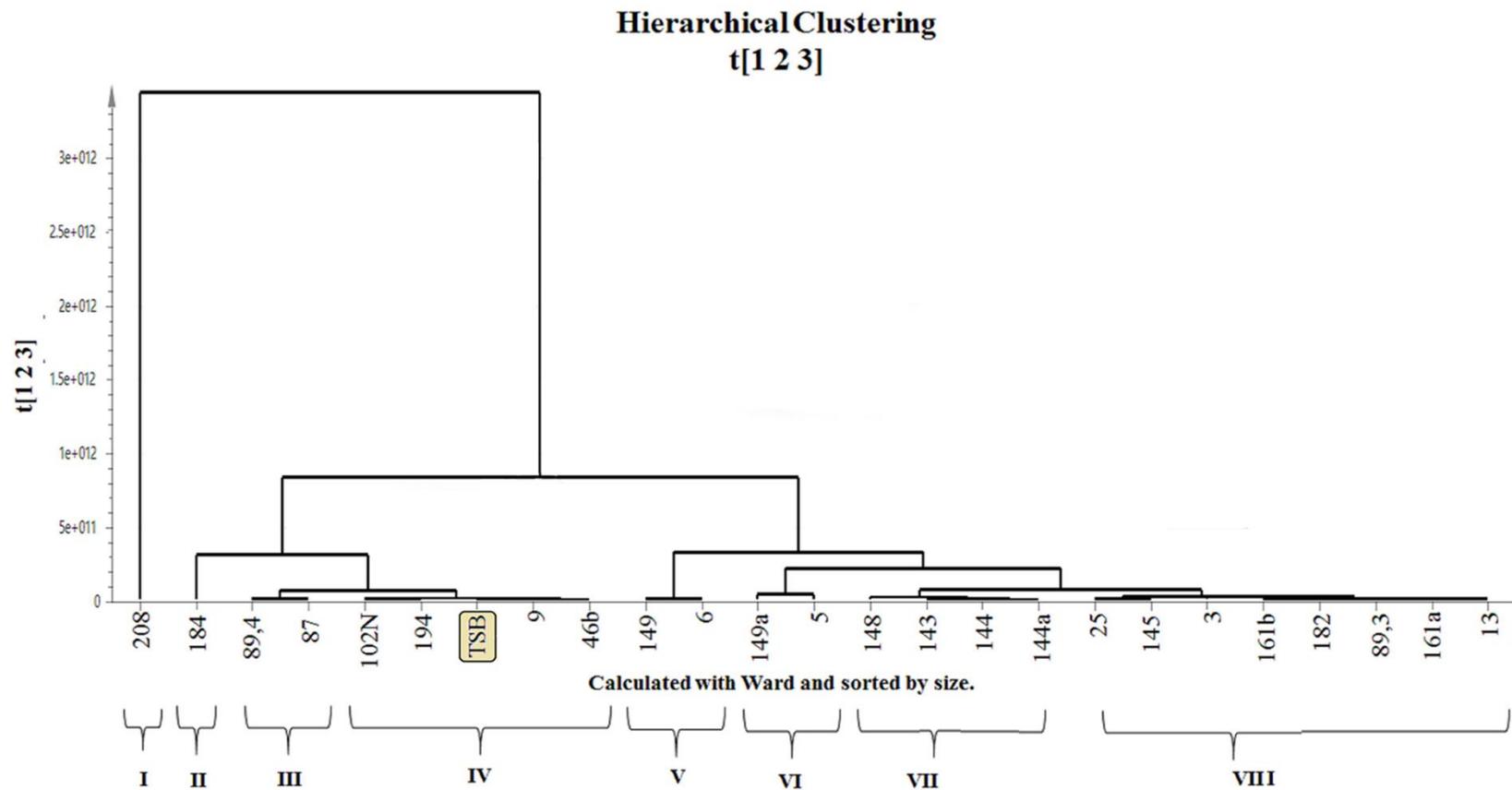


Figura 4.1 HCA (Hierarchical Clustering Analysis) basado en los perfiles metabólicos por LC-MS de los extractos orgánicos de 24 cepas de actinobacterias y el medio de cultivo TSB. Los números arábigos representan los códigos de las cepas. Los números romanos representan los cluster de acuerdo a la semejanza entre su perfil metabólico

Si bien en nuestra investigación no se llegó a la clasificación al nivel de especie, se ha reportado que diferentes cepas de *Streptomyces albus* pueden contener genes que codifican para la producción de metabolitos secundarios con diferentes esqueletos carbonados [220]. Ocho de ellos son producidos por la mayoría (si no por todos) los *Streptomyces*: la desferrioxamina y sideróforos como la aerobactina; la ectoína que actúa como osmolitos; hopanoides componentes de membrana; pigmentos carotenoides; tetrahidroxinaftalenos; el lantipeptido SapB y compuestos volátiles como la geosmina. Además en las cepas de *S. albus* se encontraron otros cluster que no están tan ampliamente conservados a nivel de género. Entre ellos la candicidina un polieno con actividad antifúngica; la antimicina, un inhibidor de la cadena respiratoria y agente anti-apoptótico; un antibacteriano, similar a la gramicidina; la albaflavenona un terpenoide volátil con actividad antibacteriana y la alteramida con actividad antifúngica [220].

Otro aspecto a destacar es la coincidencia entre el agrupamiento de los aislamientos PNM-148, PNM-143, PNM-144 y PNM-144a, los cuales agruparon en el clúster VII del HCA (Figura 4.1) y el OTU 5 del árbol filogenético, así como en el clúster del dendrograma obtenido en la huella peptídica para estos aislamientos (Figura 2.6 capítulo 2). Si bien esta información podría sugerir que se trata de aislamientos redundantes de una actinobacteria presente en la superficie de la muestra de la esponja *Niphates digitalis*, nuevamente las diferencias encontradas en las pruebas bioquímicas y en la morfología de los aislamientos en los medios de cultivo sugieren seguirlos trabajando como aislamientos de diferentes actinobacterias obtenidas de la misma fuente.

Para los otros agrupamientos observados en el HCA se encontró una baja coincidencia entre los agrupamientos generados por el HCA (Figura 4.1) y los agrupamientos del árbol filogenético, o los agrupamientos del dendrograma obtenido por el análisis MALDI-TOF (Figura 2.6), indicando que la información de la huella metabólica de estos aislamientos no resulta comparable con la información genética obtenida por la secuencia del gen 16S ARNr ni por la huella peptídica obtenida por MALDI-TOF.

Evaluación de la diversidad metabólica de los 24 aislamientos

Cuando se requiere determinar la diversidad metabólica de un conjunto de aislamientos, es importante poder contar una metodología robusta y rápida que permita identificar si la producción de cierto tipo de metabolitos es compartida entre un gran número de aislamientos, o si la producción de un metabolito es única para un aislamiento en particular.

Una de estas aproximaciones es la construcción de un “*barcoding* químico” [15], entendido como una representación gráfica de un conjunto binario de ausencia-presencia (*barcoding*), que permite visualizar de modo global el número de compuestos o variables, con el objetivo de medir la diversidad química presente en cada uno de los extractos orgánicos. En esta representación gráfica, cada compuesto corresponde a un variable la cual está representada por dos valores, el tiempo de retención (cromatografía líquida) y el ion molecular (espectro de masas).

En la gráfica del *barcoding*, los valores de presencia “1” se muestran de color negro sólido, mientras que los valores de ausencia “0” se muestran de color blanco. Así, el *barcoding* constituye una herramienta para identificar rápidamente los patrones de producción de metabolitos secundarios en un set de aislamientos. Este tratamiento de los datos obtenidos por LC-MS permite ver, además del número de variables, aquellas que se repiten en los diferentes extractos, los cuales podrían corresponder a metabolitos primarios junto con aquellas variables únicas de cada aislamiento. También permite descartar rápidamente aquellas señales provenientes del medio de cultivo.

Utilizando este código de barras, fue posible identificar algunas cepas que presentan una alta riqueza metabólica como la cepa PNM-208 (con 236 variables) y algunas cepas con baja diversidad metabólica como las cepas PNM-89.3 y PNM-182 (137 y 129 variables, respectivamente), lo que sugiere que estas últimas cepas podrían haber desarrollado la capacidad de producir menor cantidad de moléculas, pero altamente potentes como mecanismo de optimización del gasto energético que implica la producción de compuestos antimicrobianos.

Este análisis mostró además que las diferencias observadas en el HCA para la cepa PNM-208 son el producto de una alta diversidad metabólica, pues fue el aislamiento con un mayor

número de compuestos que se detectaron únicamente en ese extracto (36 variables únicas). Otras cepas como PNM-149a no muestra la producción de metabolitos exclusivos de ella, ya que todas sus variables (tiempo de retención y m/z) las comparte con otras cepas; mientras que la cepa PNM-102N por ejemplo, solo muestra la producción de una única variable exclusiva de ella identificada con el Rt 38,7 y un m/z 357,0.

La derreplicación directa de los datos generados en el *barcoding* (Rt- m/z) obtenidos para la cepa *Streptomyces* sp.PNM-208 empleando la base de datos Antimarin 2013® se presenta en el Anexo 4, donde se observó que 28 de las 36 variables, no presentaron hits en la base de datos, lo cual podría indicar que se trata de compuestos nuevos.

Los metabolitos tentativamente identificados (Anexo 4, Figura 4.3) mediante el proceso de derreplicación en la base de datos incluyeron: Policétidos como la Piericidina-C2 (m/z 446.6) antibacteriano y antihelmíntico, aislado de *Streptomyces pieridicus* y *S. pactum* [221], [222]; δ -lactonas como el Factor I de Graefe (m/z 245.3) aislado de *S. viridochromogenes* el cual actúa como inductor de la producción de antraciclina [223], [224]; derivados de ácidos grasos como ácido trihomononáctico (m/z 245.3), antibacteriano aislado de *Streptomyces globisporus* [225]; derivados de antraquinonas como la 8-O-metiltetrangomicina (m/z 337.3), compuesto antifúngico y antibacteriano aislado de una cepa no identificada del género *Streptomyces* sp. [226], [227]; alcaloides como N-acetilquestiomicina A (m/z 255.2), con actividad antitumoral y antifúngica, aislado de *S. thioluteus* [44], [228]; macrólidos como Feigrisolido D (m/z 415.1), antibacteriano aislado de *S. griseus* [229]. Adicionalmente, al detectar 28 variables que no dieron hits en los procesos de derreplicación contra la base de datos Antibase y Marinlit, sugiere la posibilidad de encontrar metabolitos nuevos en el extracto de esta cepa, lo cual indica la importancia de caracterizar la composición química del mismo.

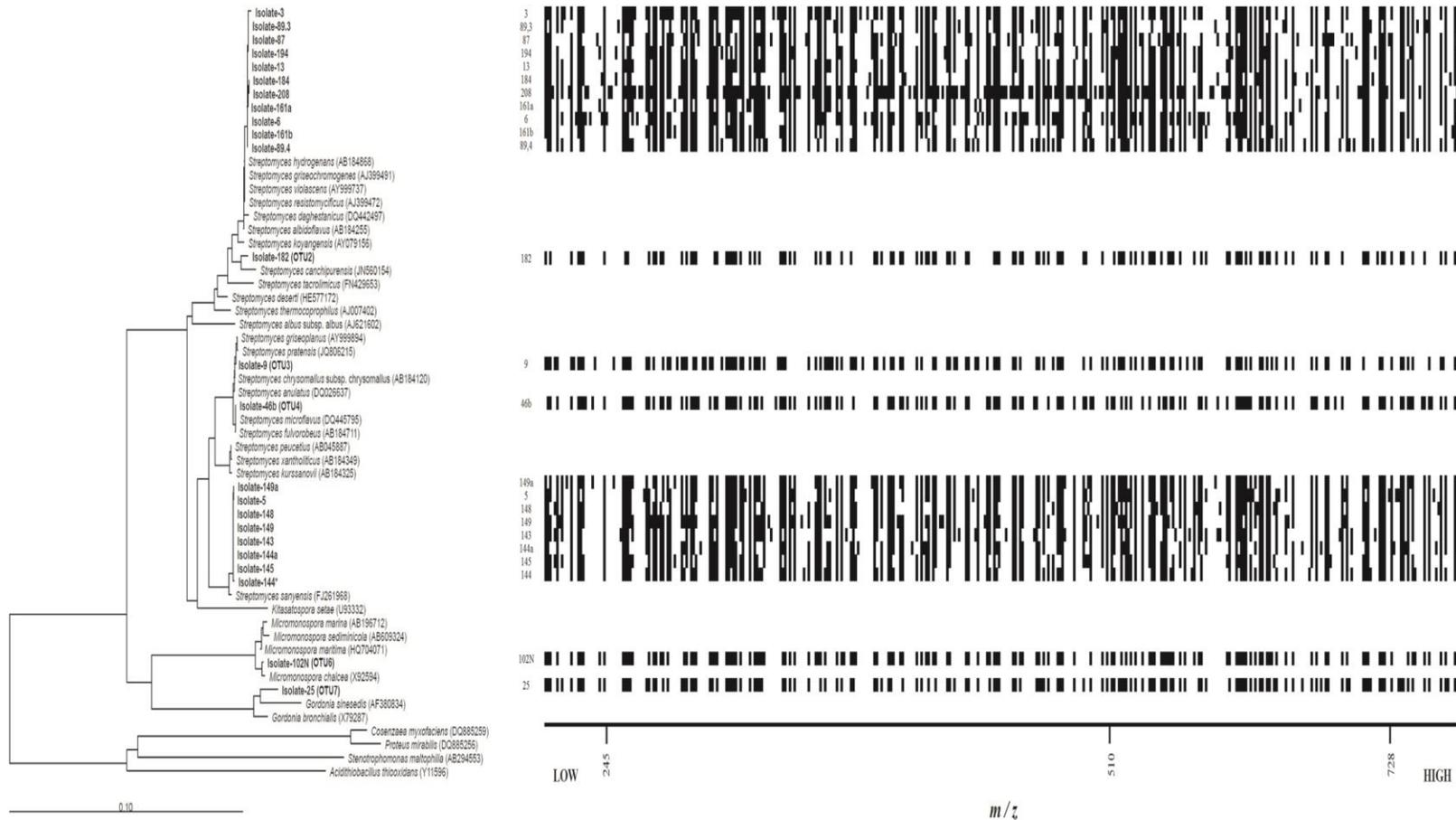


Figura 4.2 Barcoding vs Árbol filogenético. El eje horizontal muestra las variables con base en los valores de LC-MS ($R_t - m/z > 200$) de los 24 extractos. La presencia de una variable está representada por un cuadro negro. El eje vertical muestra cada una las cepas de actinobacterias de acuerdo al árbol filogenético.

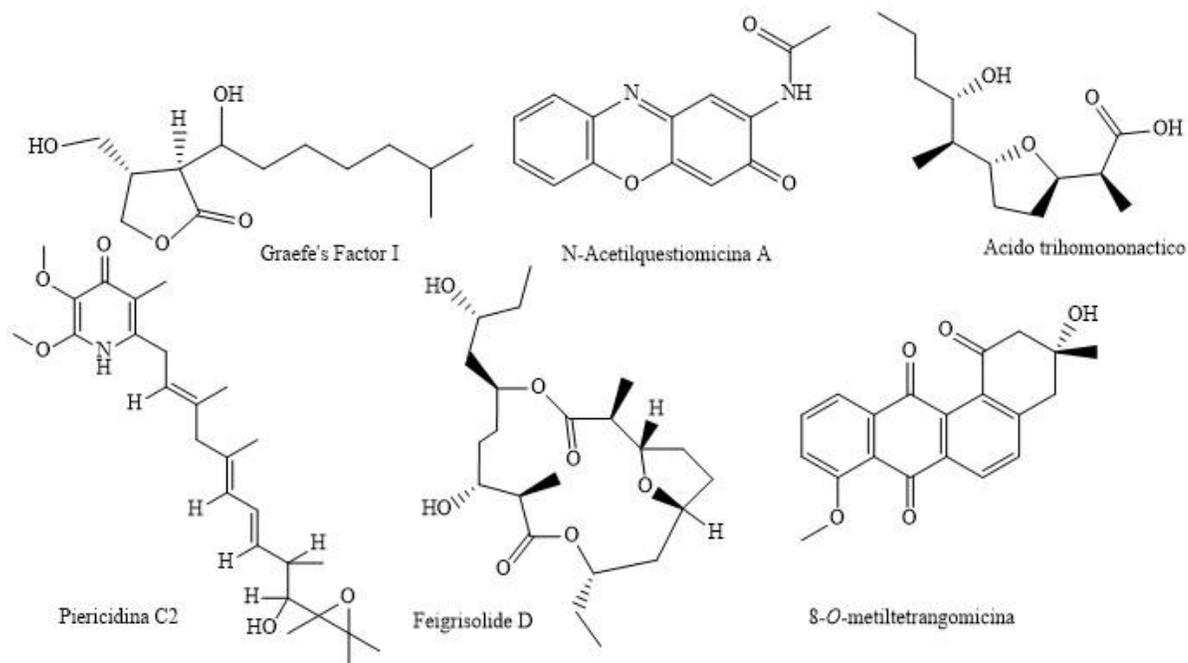


Figura 4.3 Algunos de los metabolitos tentativamente identificados mediante el proceso de derreplicación directa de los datos generados en el barcoding (Rt-m/z) obtenidos para la cepa *Streptomyces sp. PNM-208* empleando la base de datos Antimarin 2013

4.2.2 Correlación del perfil metabólico con la actividad contra fitopatógenos

Con el fin de observar las semejanzas en la composición química de los extractos de los 24 aislamientos, se realizó el análisis no supervisado de componentes principales (PCA), donde las muestras fueron evaluadas en función de su similitud, utilizando Pareto como método de escalamiento (Figura 4.4). El *Score Scatter Plot* ilustra que el primer componente explica el 38.8% de los datos y el segundo componente explica el 8.9% (Figura 4.4). Entre los dos primeros componentes explican el 47.7% de la variabilidad de sistema y no se observa ningún tipo de agrupamiento claro entre las muestras (extractos orgánicos). En el PCA también se puede reconocer al aislamiento *Streptomyces sp. PNM-208* como un *outlier* (muestra que presenta un comportamiento muy diferente a la mayoría). Lo cual confirma lo observado en el análisis jerárquico de clúster (Figura 4.1) presentado anteriormente.

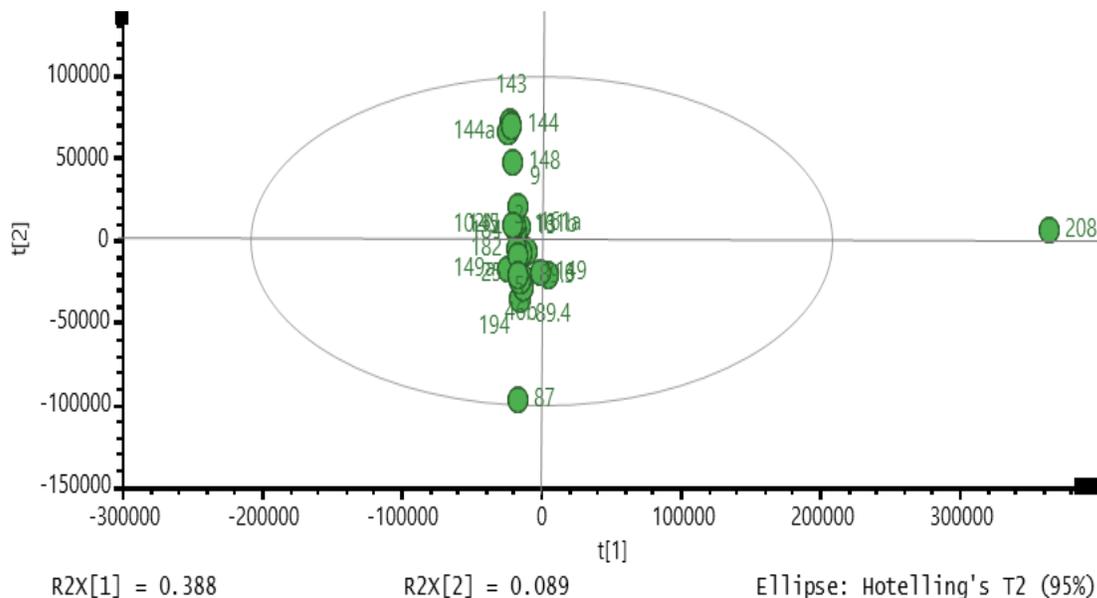


Figura 4.4 Análisis de Componentes Principales (PCA) de las 24 muestras (componentes 1 y 2)

El PCA obtenido sin los datos de la muestra PNM-208 (Figura 4.5), muestra que los dos primeros componentes explican el 30 % de la variabilidad de los datos. A pesar de esto, en esa gráfica se observa el agrupamiento de las cepas PNM- 143, 144. 144a, 148, lo cual concuerda con el cluster VII observado en el HCA de la Figura 4.1. No se logra observar la formación de otras agrupaciones en el PCA de la Figura 4.5, por lo cual no se continuó con el análisis de estas gráficas.

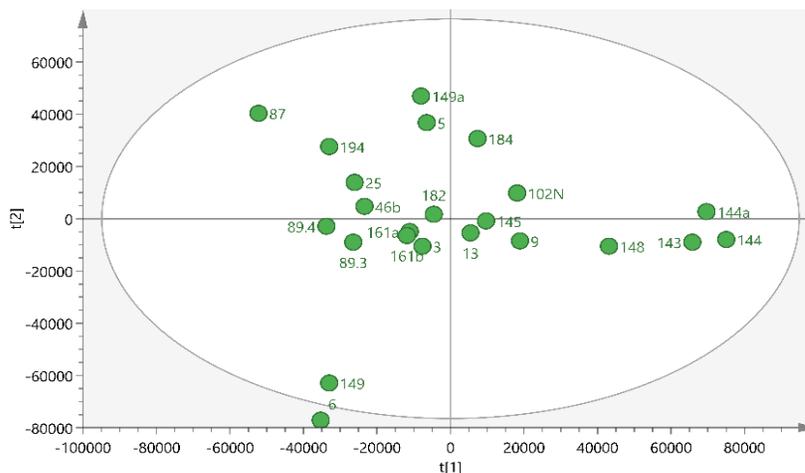


Figura 4.5 Análisis de Componentes Principales (PCA) de 23 muestras (componentes 1 y 2) excluyendo la muestra PNM-208.

Debido a que uno de los objetivos de esta tesis es evaluar la relación entre los metabolitos presentes en los extractos en acetato de etilo de las 24 actinobacterias seleccionadas y su correlación con la actividad contra los fitopatógenos de interés, se realizó un análisis multivariado supervisado (OPLS-DA).

El análisis OPLS-DA comúnmente se usa para encontrar las variables X (por ejemplo, compuestos identificados por medio de valores de R_t y m/z) que puedan estar correlacionando con variables determinantes Y (por ejemplo, alguna clase de actividad biológica como antibacteriana o antifúngica) [48]. Este análisis permite identificar desde el análisis de los datos de LCMS de los extractos las variables discriminantes (variables importantes para la proyección *VIPs*) que podrían ser las responsables de la actividad biológica, sin la necesidad de aislar los compuestos.

El análisis estadístico se realizó empleando la misma matriz de datos (.CVS) generada en EXCEL (que incluye la remoción de picos del medio de cultivo TSB). Esta matriz de datos, se cargó en el paquete estadístico SIMCA-P 14.0. (*Umetrics, Umea, Sweden*). Se realizó el análisis OPLS-DA tanto para la actividad antibacteriana como para la actividad antifúngica. Para el análisis supervisado se aplicó un escalamiento por *UV* el cual da igual importancia a todos los

metabolitos presentes en las muestras, independientemente de su concentración. En los dos análisis OPLS-DA que se presentan a continuación se aplicó este escalamiento ya que es posible que los metabolitos que se encuentran en cantidades minoritarias puedan ser aquellos compuestos responsables de la actividad biológica (opuesto al escalamiento por Pareto).

En primer lugar, se realizó un OPLS-DA (Figura 4.6 modelo A) para intentar identificar aquellas variables que podrían estar correlacionadas con la actividad antibacteriana de los extractos en acetato de etilo. En este análisis (modelo A) se observa que el extracto orgánico de *Streptomyces* sp. PNM-208 aparece como un *outlier*, lo cual podría influenciar fuertemente la variabilidad observada en este modelo. Debido a lo anterior, se hace necesario realizar un segundo análisis OPLS-DA de la actividad antibacteriana generando un nuevo modelo (Figura 4.6 modelo B) en el cual se excluyó del análisis la muestra *Streptomyces* sp PNM-208. Así el modelo B contiene los datos de LC-MS de 23 extractos en acetato de etilo de las actinobacterias contra *Burkholderia* sp.

El *Score Scatter Plot* generado a partir del modelo B presenta la separación de los extractos orgánicos de las actinobacterias en dos clases: activos y no activos. Aquellos extractos que presentaron actividad biológica contra las *Burkholderias* sp (PNM- 3, 6, 9, 13, 46b, 87, 89.3, 89.4, 143, 144a, 161a, 161b, 182, 184, 194) están representados en color verde y los extractos que fueron inactivos (PNM- 5, 25, 102N, 144, 145, 148, 149, 149a) en color azul.

Los resultados generados a partir del modelo B se presentan resumidos en los siguientes valores ($R^2X= 0.32$ $R^2Y= 0.99$, $Q^2=0.146$). Debido al valor tan bajo de Q^2 derivado del modelo B, se puede concluir que a partir del análisis supervisado OPLS-DA no se encontró una correlación significativa entre las variables discriminantes (m/z y R_t) de los extractos orgánicos y la actividad antibacteriana contra las *Burkholderias* sp. Lo anterior podría indicar que en los extractos de acetato de etilo que presentaron actividad antibacteriana existe una gran diversidad en el tipo de compuestos activos que los conforman, razón por la cual no muestran variables comunes entre sí.

Si bien durante el análisis en *el Loading Scatter Plot* - se encontraron algunos *VIPs*, la calidad del modelo generado no permite concluir cuales son los metabolitos responsables de la actividad antibacteriana, por lo cual se hace necesario aislarlos y caracterizarlos a partir de cada uno de los cultivos de los aislamientos que presentaron la actividad biológica.

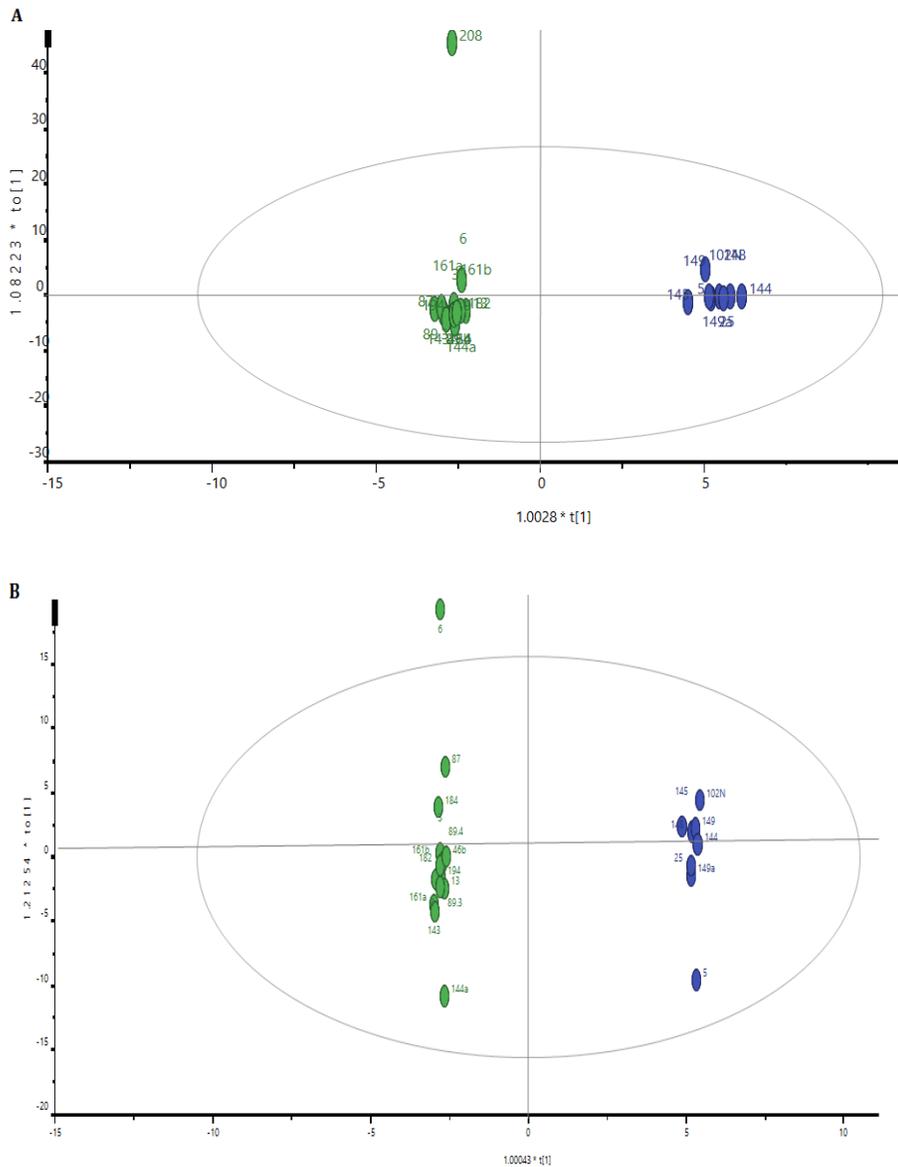


Figura 4.6 OPLS-DA- Actividad antibacteriana El *Score Scatter Plot* modelo A (izquierda) y el *Score Scatter Plot* modelo B (derecha) presentan la separación de los extractos orgánicos contra *Burkholderias* sp. en dos clases: en color verde los extractos activos y en color azul los extractos inactivos. En el modelo B se excluye del análisis la muestra PNM-208 (*outlier*).2

De manera similar, se realizó el análisis supervisado OPLS-DA de la actividad antifúngica de los 23 extractos en acetato de etilo de las actinobacterias contra el hongo fitopatógeno *C. gloeosporioides*. El *Score Scatter Plot* (Figura 4.7) presenta la separación de los extractos activos (PNM- 3, 5, 6, 13, 87, 89.3, 89.4, 143, 145, 148, 149a, 161a, 161b, 194) en color verde y los extractos inactivos (PNM- 9, 25, 46b, 102N, 144, 144a, 149, 182, 184) en color azul.

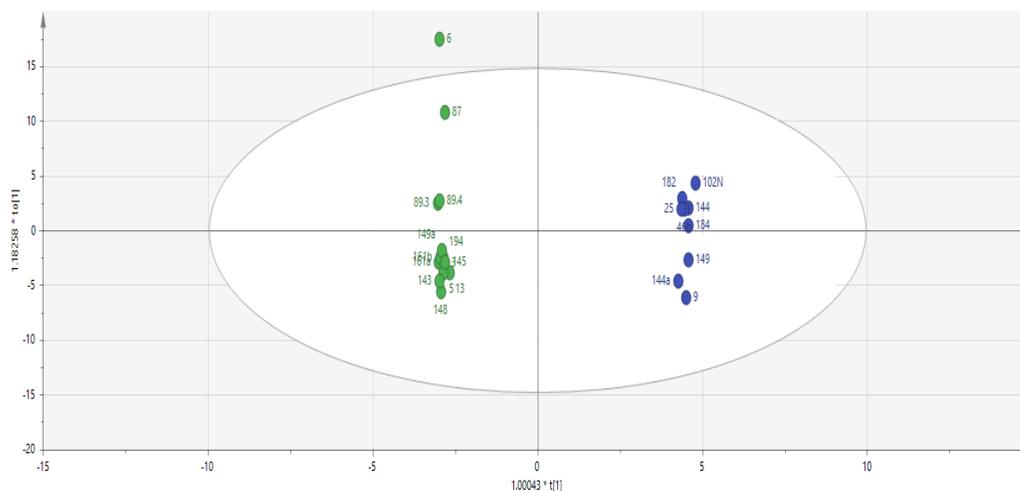


Figura 4.7 OPLS-DA- Score Scatter Plot Actividad antifúngica

Del análisis OPLS-DA para la actividad antifúngica se obtuvo el modelo que se resume a continuación: ($R^2X=0.315$, $R^2Y=0.999$, $Q^2= -0.226$). Con estos valores derivados del modelo, no hay una correlación entre las variables discriminantes (m/z y R_t) del modelo generado y la actividad antifúngica, esto se debe a que Q^2 presentó un valor negativo.

El valor negativo de Q^2 podría significar nuevamente que en la composición química de los extractos orgánicos que presentaron actividad biológica contra *C. gloeosporioides*, existe una gran diversidad metabólica y que las estructuras químicas de los compuestos responsables de la actividad antifúngica pueden ser muy diferentes entre ellas. Por tanto, en el modelo aquí generado, no se evidencian unas variables discriminantes comunes al conjunto de las muestras activas.

Así para determinar cuáles son los compuestos químicos responsables de la actividad antifúngica de los extractos de las actinobacterias, es necesario llevar a cabo procedimientos bioguiados de aislamiento y caracterización de los compuestos producidos por cada uno de los aislamientos activos seleccionados.

4.2.3 Priorización de los aislamientos para posteriores estudios químicos

Con el ánimo de aprovechar al máximo la información generada en este trabajo hasta este momento, en este estudio se integró la información sobre la taxonomía, la evaluación de la actividad biológica contra los fitopatógenos y el perfil metabólico de los 24 aislamientos para obtener criterios de selección de cepas para continuar con estudios químicos.

Tradicionalmente el procedimiento de selección de cepas para desarrollar estudios de la composición química de sus extractos tenía en cuenta únicamente los resultados de bioactividad. Sin embargo, los datos de bioactividad por sí solos, no nos proporcionan información sobre los compuestos químicos responsables de la misma. Lo anterior puede llevar a seleccionar cepas ya conocidas y que producen compuestos previamente identificados.

De manera análoga, la selección de cepas basada únicamente en los datos de los análisis filogenéticos es útil como guía para seleccionar de una colección, cepas de un género específico o especies de interés particular, o incluso para descartar, aislamientos redundantes o aquellas cepas que puedan presentar patogenicidad. Sin embargo, estos datos taxonómicos por sí solos, no proporcionan información acerca de la producción metabólica o de la bioactividad de los aislamientos. Adicionalmente, se conoce que hay cepas que a pesar de estar filogenéticamente relacionadas, no producen los mismos metabolitos secundarios, y que cepas pertenecientes a clados diferentes, pueden presentar una producción similar de metabolitos secundarios [230], [231], lo cual confirma que este criterio taxonómico por sí solo no guarda correlación con la posible diversidad química del aislamiento.

Por otra parte, si sólo tenemos en cuenta la información generada a partir de los perfiles metabólicos como un criterio para la selección de muestras, éstos solamente nos darán

información sobre la alta o baja diversidad química de los aislamientos. Si bien se espera que aislamientos productores de varios compuestos antimicrobianos, puedan contribuir a reducir los fenómenos de resistencia, cuando sean aplicados como tratamiento para fines de control de fitopatógenos, también resulta probable que aquellas bacterias que producen gran número de metabolitos los produzcan, pero en cantidades pequeñas, lo cual dificultaría los procesos de aislamiento e identificación.

Otro argumento a considerar resulta de interpretar que las diferencias observadas en el HCA, podrían provenir de extractos con baja diversidad de compuestos, lo que sugiere que las cepas podrían haber desarrollado la capacidad de producir pocas moléculas, pero altamente potentes como mecanismo de optimización del gasto energético que implica la producción de compuestos antibióticos o disuasores. Adicionalmente, el uso exclusivo de la información generada a partir del perfilado metabólico (LC-MS) por sí solo, no permite hacer la correlación directa con la actividad biológica observada.

En este trabajo se aplicó una estrategia de integración de la información generada considerando aquellos aislamientos de actinobacterias que representen la mayor diversidad taxonómica (Figura 2.5 capítulo 2) y química (Figura 4.1 HCA y Figura 4.2 *barcoding*) y que puedan mostrar o bien actividad de amplio espectro o bien actividad específica contra un solo tipo de fitopatógeno (Figura 3.4 capítulo 3). Utilizando esta aproximación y como resultado de la integración de los datos de taxonomía, el perfilado metabólico y la información de la bioactividad de los aislamientos se priorizaron cinco cepas para realizar estudios químicos posteriores (Tabla 4.2).

Tabla 4.1 Priorización de cepas para futuros estudios químicos

Aislamiento	Análisis filogenético No. del cluster (OTU)	Perfilado metabólico No. de cluster (HCA)	Actividad Biológica		
			Enfrentamiento directo	Extracto orgánico	Extracto acuoso
PNM-161a	1	VIII	4	3	2
PNM-208	1	I	4	2	3
PNM-9	3	IV	3	2	1
PNM-182	2	VIII	3	2	1
PNM-5	5	VI	5	1	1

El aislamiento *Streptomyces* sp. PNM-161a, agrupó de acuerdo a su taxonomía en el OTU 1 y su extracto orgánico presentó el espectro de actividad antimicrobiana más amplio, siendo activo contra tres de los cinco fitopatógenos evaluados (*B. glumae*, *B. plantarii* y *C. gloeosporioides*) (Figura 3.4). Además, su extracto orgánico presenta diferencias grandes en su perfil metabólico cuando se compara con el clúster IV, el cual contiene al medio de cultivo usado como referencia de la producción metabólica (Figura 4.1). Cuando se analizan los datos del barcoding el extracto de esta cepa presenta de 140 variables (tiempo de retención y m/z), 137 las comparte con otras cepas y tres metabolitos son exclusivos de ella

Otros aislamientos con espectro de actividad similar, como por ejemplo *Streptomyces* sp PNM-194 resultaron de poco interés, pues a pesar de que no comparte el mismo cluster en el HCA con *Streptomyces* sp. PNM-161a, su perfil metabólico es bastante similar al del blanco TSB, lo que indica que la recuperación de los metabolitos secundarios de su extracto podría ser un proceso difícil.

De otro lado, el aislamiento *Streptomyces* sp. PNM-208, a pesar de que agrupa en el mismo OTU 1 que la cepa *Streptomyces* sp. PNM-161a, resultó de gran interés, por presentar el perfil metabólico más diverso de los 24 aislamientos evaluados, de acuerdo a los datos del HCA (Figura 4.1) y el barcoding químico (Figura 4.2). Además, su extracto orgánico presenta actividad antimicrobiana contra dos de los fitopatógenos evaluados (*B. plantarii* y *C. gloeosporioides*) (Figura 3.4).

Un segundo grupo de aislamientos que merecen atención son aquellos con actividad selectiva como antibacterianos, con perfiles metabólicos diferentes y que representan OTUs con una única especie. Tal es el caso de los aislamientos *Streptomyces* sp. PNM-9 (grupo IV en HCA y único representante del OTU 3) y *Streptomyces* sp. PNM-182 (grupo VIII en HCA y único representante del OTU 2). Los extractos orgánicos de estos aislamientos presentan actividad antimicrobiana contra dos de las tres bacterias fitopatógenas evaluadas. Para el caso de *Streptomyces* sp. PNM-9 su extracto orgánico controla a *B. glumae* y *B. gladioli*. En el caso de *Streptomyces* sp. PNM-182 su extracto orgánico logró controlar a *B. gladioli* y *B. plantarii* (Figura 3.4).

En cuanto a los aislamientos con actividad antifúngica selectiva, el extracto orgánico del aislamiento *Streptomyces* sp. PNM-5 presentó actividad contra *C. gloeosporioides*. Este aislamiento agrupa en el cluster VI (HCA) junto con la cepa *Streptomyces* sp. PNM-149a y ambas pertenecen al OTU 5; Sin embargo, la cepa *Streptomyces* sp. PNM-5 mostró una actividad antifúngica más fuerte que *Streptomyces* sp. PNM-149a (datos no mostrados).

De acuerdo con la priorización cepas, realizadas mediante la estrategia de integración de datos, decidimos continuar con los estudios químicos de aislamiento y elucidación de los compuestos responsables de la actividad biológica de las cepas *Streptomyces* sp. PNM-9, *Streptomyces* sp. PNM-161a y *Streptomyces* sp. PNM-208, cuyos resultados se muestran en los siguientes capítulos de este documento.

4.3 Conclusiones

La evaluación de la diversidad metabólica de 24 cepas de actinobacterias marinas, mostró la formación de ocho agrupaciones diferentes (cluster I a VIII) de acuerdo con su perfil químico por LC-MS. De este análisis se observaron desde aislamientos con un perfil metabólico particular como PNM-208, hasta perfiles muy similares al perfil metabólico del medio de cultivo (TSB).

Las agrupaciones obtenidas por medio del HCA de los perfiles metabólicos de los extractos orgánicos no mostró correlación con la información genética obtenida por la secuencia del gen 16S ARNr ni por la huella peptídica obtenida por MALDI-TOF.

Por medio de la construcción del *barcoding* químico, fue posible identificar algunas cepas que producen un alto número de metabolitos como la cepa *Streptomyces* sp PNM-208 (con 236 variables de las cuales 36 variables son únicas de ese aislamiento) mostrando además que las diferencias observadas en el HCA para *Streptomyces* sp PNM-208 son producto de una alta diversidad metabólica. De las 36 variables únicas, se observaron pocas coincidencias utilizando la derreplicación contra las bases de datos Antibase y Marinlit, lo cual sugiere la importancia de estudiar la composición química del extracto orgánico de *Streptomyces* sp PNM- 208.

El desarrollo de una estrategia de integración del perfilado metabólico, la taxonomía y la bioactividad de las 24 cepas de actinobacterias recuperadas de ambientes marinos, en conjunto con los procesos de derreplicación, nos permitió realizar la selección de los aislamientos *Streptomyces* sp. PNM-161a, *Streptomyces* sp. PNM-208, *Streptomyces* sp. PNM-9, *Streptomyces* sp. PNM-182 y *Streptomyces* sp. PNM-5, como fuente de compuestos para el control de fitopatógenos.

4.4 Materiales y métodos

4.4.1 Análisis del perfil metabólico de las actinobacterias

4.4.1.1 Preparación de la muestra y análisis de HPLC-MS

Los análisis por HPLC-MS se realizaron siguiendo el protocolo que se describe a continuación: Los extractos en acetato de etilo de cada aislamiento, obtenidos según las condiciones de cultivo descritas en el capítulo 3 junto con los extractos de los blancos de medio se prepararon en MeOH a una concentración de 1 mg/mL. Los experimentos de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas se llevaron a cabo en un equipo HPLC LaChrom (VWR HITACHI-ELITE) acoplado a un espectrómetro de masas ESI-IT Amazon X (Bruker-Daltonics).

El escaneo de masas MS se realizó en un rango de m/z entre 70-3000 tanto en modo positivo como negativo; temperatura del capilar 250°C y 4.0 kV. El análisis cromatográfico se llevó a cabo en una columna XTerra C-18 (4,6 x 150 mm, 5 μ m) y un flujo de 1,0 mL/min. Los solventes empleados en la elución fueron: agua con 0,075% de ácido fórmico (fase A) y acetonitrilo con 0,075% de ácido fórmico (fase B). El programa de disolventes comenzó con 10% de B durante 3 min y un incremento lineal hasta 40% de B en 17 min, seguido por un incremento lineal hasta 100% de B en 15 min, seguido de 10 min a 100% de B. El tiempo de análisis total para cada muestra fue de 50 min. La muestra (20 μ L) fue inyectada por un automuestreador. Una vez adquiridos los datos de masas con extensión. Raw fueron convertidos al formato *.netCDF* en el programa *DataAnalysis* de Bruker, para poder ser exportados y analizados en el programa *MZmine 2.10*

4.4.1.2 Analisis de los datos

Tratamiento de datos por *MZmine 2.10*

Este programa de libre acceso permite la construcción de matrices a partir de datos generados por HPLC-MS. Para la construcción de las matrices de datos se realizó el pre-procesamiento de datos que incluyó los pasos de detección de masas, construcción de cromatogramas, deconvolución de picos, filtrado de isótopos, detección de aductos y finalmente un alineamiento entre las muestras y el blanco de medio [137], [157]. La descripción de los módulos utilizados para el tratamiento de los datos que se presenta a continuación se hizo con base en el manual del programa [232].

En el módulo de detección de masas (*Mass detection*), se generan unas listas de masas (iones) por cada *scan* en los archivos de los datos crudos. En este estudio se usó el algoritmo *Centroid mass detector*, el cual asume que cada señal por encima de un nivel dado de ruido es un ion detectado. El nivel de ruido por tanto se define como la mínima intensidad de un dato puntual para ser considerado parte del cromatograma y todos los datos por debajo de ese nivel de intensidad serán descartados. Ese nivel se determina de acuerdo a la calidad de los datos. En este estudio se usó un nivel de ruido de 1×10^5 .

El siguiente módulo se denomina construcción de cromatogramas (*Chromatogram building*), el cual toma las listas de masas generadas para cada *MS scan* y construye un cromatograma para cada valor de masa que pueda ser detectada continuamente a lo largo de los *scans* generando finalmente una lista depurada de picos. Este módulo usa parámetros de tolerancia de *m/z* (*m/z tolerance o ppm*), duración mínima en tiempo (*Min time span*) y altura mínima (*Min height*); para el estudio se utilizaron 1 *m/z* o 100 ppm, 1 min, 1.1×10^5 respectivamente.

La lista de masas creada en el paso anterior es procesada en orden decreciente de intensidad y cada ion es conectado con el cromatograma apropiado de acuerdo al parámetro de tolerancia de *m/z*. Cuando no se encuentra un cromatograma que coincida, un nuevo cromatograma es creado con la *m/z* del ion. Cuando un cromatograma es terminado (no hay más picos con *m/z* a los cuales ser conectado), su duración en tiempo (*time span*) e intensidad (*height*) son evaluadas de acuerdo a los parámetros establecidos. Aquellos cromatogramas que se ajusten a los parámetros son añadidos a la lista de picos final.

Luego de la construcción de cromatogramas se aplicó la deconvolución de picos individuales (*Peak deconvolution*). En el programa se ofrecen varios algoritmos que permiten hacer este proceso. Para este estudio fue utilizado *Baseline cut-off*, que remueve la parte más baja de los cromatogramas debajo de una línea base determinada. Los picos que estén por encima del nivel de la línea base son reconocidos si completan los requerimientos mínimos de altura y duración. Los parámetros usados en este módulo fueron: *Baseline level* 1.0×10^5 *Min peak height* 1.1×10^5 *Peak duration range* 1-10 min.

Con la aplicación del módulo agrupamiento de isótopos (*Isotopic peak grouper*) se pretende encontrar en la lista de picos, aquellos que hagan parte del mismo patrón isotópico y solamente el pico más alto se mantiene en la lista. Los parámetros usados fueron: *m/z tolerance* 1 o 100 ppm; *Retention time tolerance* 1 min; maximum charge 3. En este punto es importante resaltar que los parámetros seleccionados para *MZmine* se eligieron de acuerdo con las características del sistema LC-MS (Resolución, etc.) y resultados experimentales (tiempo de retención y *m/z*).

A continuación, se aplicó el módulo de alineamiento, cuyo propósito es unir los picos encontrados en las diferentes muestras. Los picos cromatográficos así detectados se alinearon

basándose en la masa y el tiempo de retención de cada uno de ellos. De esta manera se genera una matriz en donde se relacionan los compuestos detectados ubicados en las filas, con las muestras analizadas, las cuales están ubicados en las columnas. Este procedimiento permite reconocer los picos en común que comparten los diferentes extractos y los picos que estos extractos comparten con el blanco de medio cultivo, lo cual permite excluir si fuese necesario, estos últimos del análisis. El algoritmo usado para el alineamiento fue *Joining alignment*, y los parámetros utilizados en este módulo son: *m/z tolerance* 1 o 100 ppm; *Retention time tolerance* 1 min.

Después del alineamiento, se aplicó el módulo denominado *Gap Filling* usando los siguientes parámetros: *intensity tolerance* 20%; *retention time tolerance* 1 min. En el módulo de detección de aductos (*Adduct search*) el programa identifica y etiqueta los aductos presentes en la lista de picos. Los aductos son identificados bajo dos condiciones: el tiempo de retención del ion original y del aducto debe ser el mismo; y la diferencia de masa entre el ion original y el aducto debe ser igual a uno de los aductos seleccionados como posibles. Los parámetros usados en este módulo fueron: *Retention time tolerance* 1 min; *m/z tolerance* 1 o 100 ppm; *Max relative adduct peak height* 50 %.

Posterior a este procesamiento de datos, la lista de picos alineados se exportó como un archivo de valores separados por comas (.CSV). Este archivo se utilizó para realizar posteriores análisis sobre la diversidad metabólica de los extractos (*barcoding* químico y HCA) [15] y la derreplicación de algunas variables de interés en la base de datos Antimarin.

Esta matriz de datos, se cargó en el paquete estadístico SIMCA-P 14.0 (Umetrics, Umea, Sweden) [137]. Inicialmente se realizó un análisis no supervisado de componentes principales (PCA) utilizando Pareto como método de escalamiento y posteriormente y empleando la misma matriz de datos (.CVS) generada en EXCEL (incluyendo la remoción de picos del medio de cultivo TSB). Se realizó un análisis multivariado supervisado (OPLS-DA) para intentar identificar aquellas variables discriminantes *VIPs* (valores *m/z* y *Rt*) que podrían estar correlacionadas con la actividad antimicrobiana de los extractos en acetato de etilo

Estimación de la diversidad metabólica

Para la construcción del *barcoding* químico se exportaron los datos procesados en *MZmine* como archivo CSV a Microsoft Excel y de cada set de datos de cada una de las cepas, se eliminaron aquellos datos observados también para el blanco de medio y sólo se consideran valores $m/z > 200$, buscando que las únicas variables que queden correspondan a los compuestos totales detectados en cada uno de los extractos. Con la matriz de datos así construida, se generó un código de barras (*barcoding*), empleando Microsoft Excel a través de la función IF (= IF (cell> 0,1,0)) [15].

El *barcoding* químico es un conjunto de datos binarios (presencia-ausencia) de cada compuesto presente en un extracto bacteriano. La figura obtenida se basa en los datos de LC-MS de cada uno de los extractos en AcOEt de las 24 *Actinobacterias* y representa la diversidad química de los mismos sin tener en cuenta su concentración. El eje horizontal muestra las variables con base en los valores de LC-MS (R_t y $m/z > 200$) de los 24 extractos.

La presencia de una variable “1” está representada por un cuadro negro, mientras que la ausencia “0” se representa por un cuadro blanco. El eje vertical muestra cada una las cepas de *Actinobacterias* de acuerdo al árbol filogenético presentado en el capítulo 2. Adicionalmente, esta herramienta de Excel nos permitió remover aquellas variables (R_t y m/z) asociadas con el medio de cultivo TSB (empleado como blanco). Posteriormente se realizó el proceso de derreplicación de algunas variables de interés, haciendo uso de la base de datos Antimarin 2013 especializada en compuestos aislados de organismos marinos y microorganismos [137].

5. Tetrapéptidos cíclicos y dicetopiperazinas producidas por *Streptomyces* sp. PNM-161a con actividad contra bacterias y hongos fitopatógenos

5.1 Introducción

La cepa *Streptomyces* sp. PNM-161a, obtenida de una muestra de *Bryopsis* sp. (Chlorophyta) fue seleccionada en este trabajo para estudiar su producción de metabolitos secundarios teniendo en cuenta los resultados de la estrategia de integración presentada en el capítulo anterior. El aislamiento *Streptomyces* sp. PNM-161a mostró un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra tres de los cinco fitopatógenos ensayados *B. glumae*, *B. gladioli* y *C. gloeosporioides* (Figura 3.4). El análisis filogenético (capítulo 2) indicó que los vecinos cercanos de esta cepa son *Streptomyces griseochromogenes*, *S. violascens*, *S. resistomycificus*, *S. exfoliatus* y *S. albidoflavus*, todos ellos con un 99.86% de similitud [158].

De *S. albidoflavus* se han aislado compuestos como la pikromicina, un macrólido con actividad antibiótica de amplio espectro al unirse a la subunidad 23S del rRNA bacteriano; la proactimicina A un agente bacteriostático contra bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* [233]; la antimicina A₁₈, un compuesto con actividad antifúngica contra fitopatógenos como *Colletotrichum lindemuthianum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani* y *Magnaporthe grisea* [234]. Así mismo, *S. griseochromogenes* produce compuestos con actividad antifúngica como la blasticidina [141] y cepas de *S. violascens*, *S. resistomycificus* han permitido el aislamiento de compuestos de antibióticos como las actinomicinas, germicidinas, entre otros.

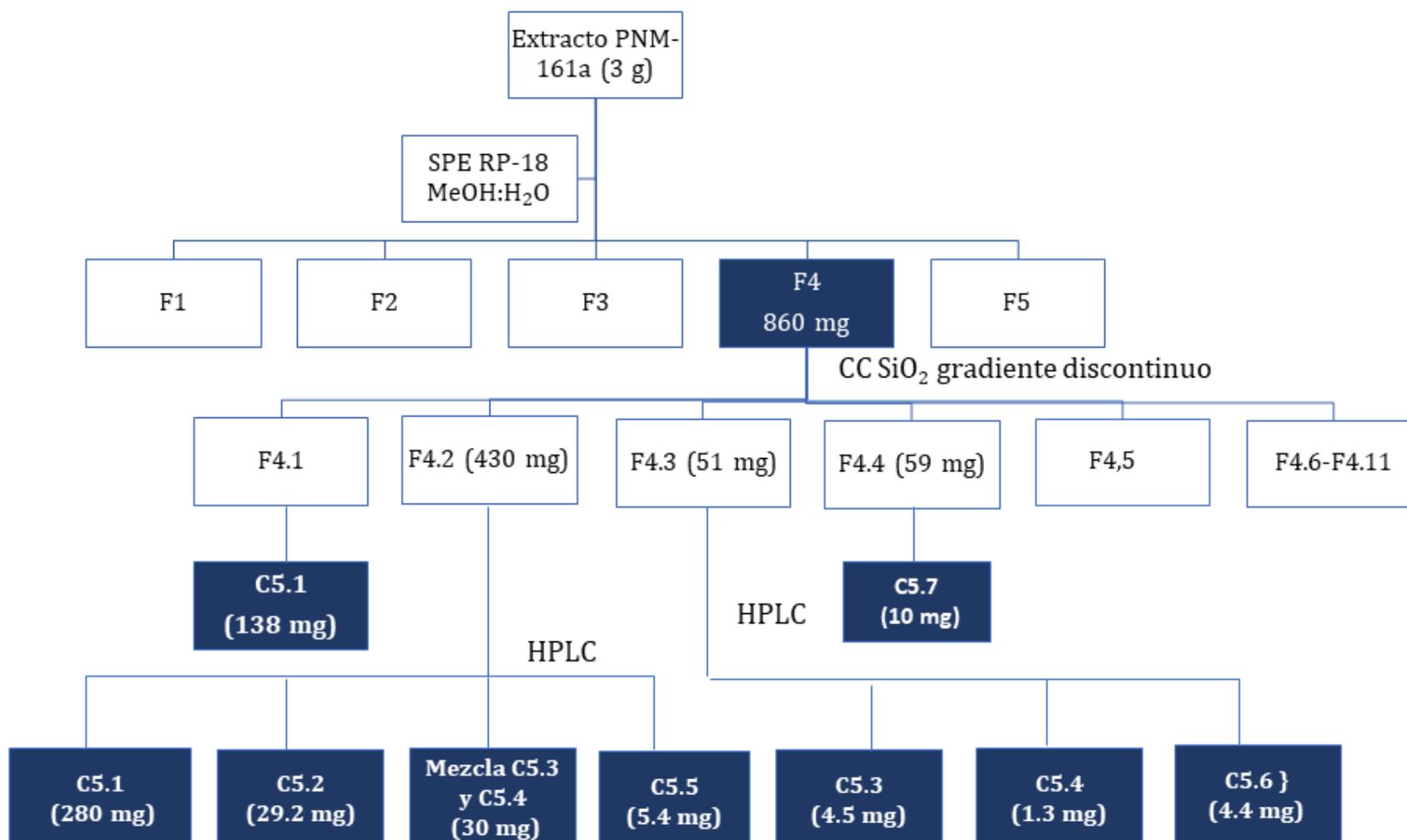


Figura 5.1 Esquema de fraccionamiento del extracto orgánico obtenido de *Streptomyces* sp. PNM-161a.

En este capítulo, se presenta el aislamiento e identificación de siete compuestos a partir del extracto orgánico, a los que se les evaluó su actividad antimicrobiana contra las bacterias *B. glumae*, *B. gladioli* y el hongo fitopatógeno *C. gloeosporioides*.

5.2 Resultados y Discusión

Con el objetivo de identificar los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana del extracto en AcOEt de *Streptomyces* sp. PNM-161a, este aislamiento fue cultivado en medio líquido LB (40 L), los cuales fueron extraídos con AcOEt y fraccionados por SPE (Figura 5.1). A partir de la fracción F4 (70% MeOH), que mostró actividad antimicrobiana, se aislaron por técnicas cromatográficas los compuestos que se presentan a continuación.

5.2.1 Compuesto 5.1

El compuesto **5.1** (418 mg) fue aislado como un sólido blanco, con una rotación óptica de $[\alpha]^{23}_D$ -15.04 ($c = 0.1$, MeOH). En el espectro de masas se observó la presencia de un ión en m/z 477.2471, consistente con el aducto de sodio para una fórmula molecular $C_{25}H_{34}N_4O_4$ (calculada para $C_{25}H_{34}N_4O_4Na$ $m/z = 477.2478$, $\Delta 1.4$ ppm).

En el espectro de RMN- 1H (400 MHz, metanol- d_4 , Tabla 5.1, Anexo 5), se observaron señales características de un péptido con un protón NH de amida en δ_H 7.91 (1H, bs), un anillo aromático monosustituido en δ_H 7.31–7.22 (5H, m), cuatro metinos en δ_H 4.45 (1H, dt, $J = 4.9$, 1.6 Hz), δ_H 4.25 (1H, dt, $J = 7.7$, 1.5 Hz), δ_H 4.13 (1H, m), δ_H 4.07 (1H, dd, $J = 6.5$, 1.7 Hz) sugiriendo que el compuesto **5.1** tiene cuatro residuos de aminoácidos. Adicionalmente, se obtuvieron señales para ocho metilenos en δ_H 3.54 (1H, m) - δ_H 3.38 (1H, m); δ_H 3.52 (1H, m) - 3.35 (1H, m); δ_H 3.17 (2H, dd, $J = 4.9$, 2.5 Hz); δ_H 2.30 (1H, m) - δ_H 1.94 (1H, m); δ_H 2.11 (1H, m) - δ_H 1.27 (1H, m); δ_H 2.02 (2H, m); δ_H 1.92 (1H, m) - 1.52 (1H, t, $J = 7.7$ Hz) y δ_H 1.80 (2H, m), junto con un grupo metino en δ_H 1.89 (1H, m) y dos grupos metilo en δ_H 0.97 (3H, d, $J = 6.3$ Hz) y δ_H 0.95 (3H, d, $J = 6.3$ Hz).

En el espectro de RMN- ^{13}C (100 MHz, metanol- d_4), Tabla 5.1, Anexo 6) se observan cuatro señales de carbono carboxílico características de amida en δ_C 172.8, δ_C 170.9, δ_C 168.9 y δ_C 166.9, junto con cuatro metinos unidos a nitrógeno en δ_C 60.3, δ_C 60.1, δ_C 57.8 y δ_C 54.6, confirmando la presencia de cuatro residuos de aminoácidos. Adicionalmente, el espectro mostró señales para un anillo aromático monosustituido en δ_C 137.3, δ_C 131.0 (X2); δ_C 129.5

(X2) y δ_c 128.1; siete metilenos en δ_c 46.5, δ_c 45.9, δ_c 39.4, δ_c 29.4, δ_c 29.3, δ_c 23.6 y δ_c 23.3, un metino en δ_c 37.1 y dos carbonos característicos de metilos en δ_c 22.7 y δ_c 22.2. Los datos del compuesto **5.1** (COSY, HMBC y HSQC Anexos 7-9 indicaron que se trata de un tetrapeptido, el cual contiene un residuo de Phe, un residuo de leucina (Leu) y dos residuos de Pro.

Tabla 5.1 Datos de RMN de 5.1 en metanol- d_4 (RMN- 1H a 400 MHz; RMN- ^{13}C a 100 MHz)

Residuo	Posición	δ 1H, integr, mult, (J en Hz)	δ ^{13}C mult.
Leucina	α	4.13, 1H, m	54.6 CH
	β	1.92, 1H, m	39.4, CH ₂
		1.52, 1H, t, 7.7	
		1.89, 1H, m	25.7, CH
	δ	0.96, 3H, d, 6.3	22.7, CH ₃
	δ (CH ₃)	0.96, 3H, d, 6.3	22.2, CH ₃
	CO		168.9, C
	NH	7.91, 1H, bs	
Prolina-1	α	4.25, 1H, dt, (7.7, 1.5)	60.1, CH
	β	2.30, 1H, m	29.3, CH ₂
		1.94, 1H, m	
	γ	2.02, 2H, m	23.6, CH ₂
	δ	3.52, 1H, m	46.5, CH ₂
		3.35, 1H, m	
	CO	-	172.8, C
Fenilalanina	α	4.45, 1H, dt, (4.9, 1.6)	57.8, CH
	β	3.17, 1H, dd (4.9; 2.5)	38.2 CH ₂
		1	
	2-6	7.31-7.22, 5H, m	131.0 x 2, CH 129.5 x 2, CH 128.1, CH
	CO		166.9, C
	NH	ND	
Prolina 2	α	4.07, 1H, dd, (6.5, 1.7)	60.3, CH
	β	2.11, 1H, m	29.4, CH ₂
		1.27, 1H, m	
	γ	1.80, 2H, m	23.3, CH ₂
	δ	3.54, 1H, m	45.9, CH ₂
		3.38, 1H, m	
CO	-	170.9, C	

La secuencia de aminoácidos fue determinada mediante HMBC (metanol- d_4), donde se observó la correlación del protón α del residuo Pro-1 en δ_H 3.52 con el carboxilo del residuo Leu en δ_c

168.9. También se observó la correlación del protón α del residuo Pro-2 en δ_H 3.38 con el carboxilo del residuo Phe en δ_C 165.1. De otro lado, debido a la ausencia de correlaciones en el espectro medido en metanol- d_4 , un segundo experimento HMBC medido en DMSO- d_6 (Anexo 10), permitió observar las correlaciones de un segundo protón NH asignado al residuo Phe en δ_H 8.00, con el carbono carboxílico de la Phe en δ_C 165.1 y con el carbono δ_C 58.4 asignado a la Pro-1 (Figura 5.2). Por otro lado, el protón en δ_H 3.35 asignado a la posición δ del residuo Pro-2 mostró correlación con el carboxilo de la Phe en δ_C 165.1. Se encontró que la unidad de Leu está ubicada entre las dos unidades de Pro por las siguientes correlaciones en HMBC: desde el protón δ del residuo Pro-1 en δ_H 3.28 que correlaciona con el grupo carbonilo del residuo Leu a δ_C 166.6 y la correlación desde el protón NH del residuo Leu a δ_H 7.91 al carboxilo del residuo Pro-2 en δ_C 169.0, confirmando así la estructura cíclica del compuesto **5.1** donde dos residuos de Pro están flanqueados por una unidad de Phe por un lado y por el residuo de Leu por el otro, como se presenta en la Figura 5.2.

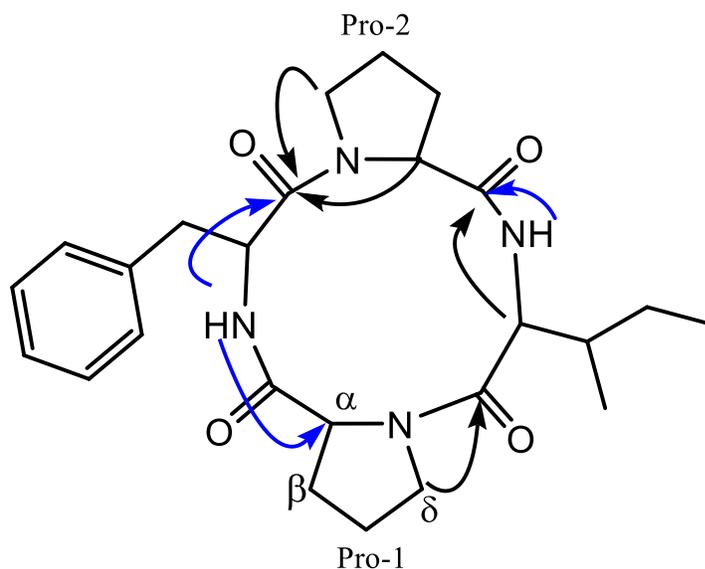


Figura 5.2 Correlaciones clave de HMBC para el compuesto **5.1**. En azul se presentan las correlaciones observadas en el experimento medido en DMSO- d_6 y en negro las observadas en el experimento medido en metanol- d_4 .

La configuración absoluta de los aminoácidos del compuesto **5.1** fue establecida por el método de Marfey. El cromatograma obtenido para el hidrolizado del compuesto **5.1** (Figura 5.3a)

luego de su derivatización con los derivados L-FDAA y D-FDAA, permitió la detección de tres picos cromatográficos con tiempo de retención 4.98 min, 12.36 min y 12.85 min, los cuales coincidieron con los tiempos de retención y con los espectros UV de los patrones de la L-Pro, L-Leu y L-Phe, respectivamente (Figura 5.3b). En el cromatograma del hidrolizado se observa un pico cromatográfico en 5.943 min, el espectro UV de este pico presenta una banda de absorción en 290 nm (Anexo 11) que no corresponde con el espectro UV del derivado del aminoácido patrón (Anexo 11), indicando que este pico no es el derivado de la D-prolina.

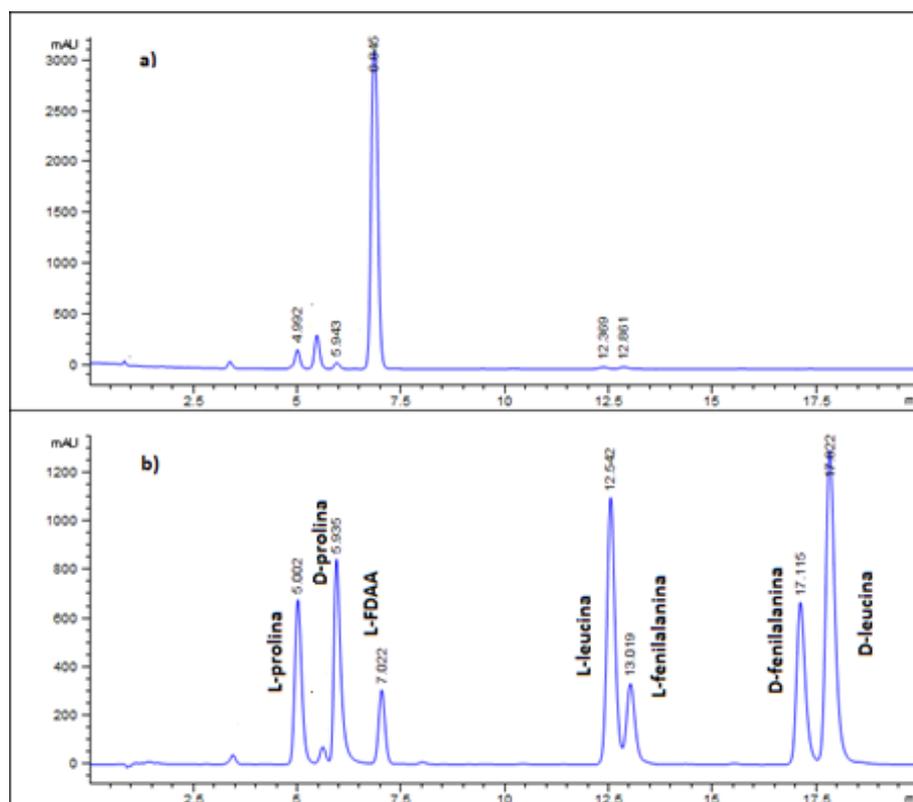


Figura 5.3 Cromatograma de los derivados en a y los patrones en b del compuesto 5.1

De esta manera, se logró determinar que el compuesto 5.1 es un tetrapéptido cíclico que está conformado por los aminoácidos L-Phe, L-Leu y L-Pro, cuya estructura se presenta en la Figura 5.4.

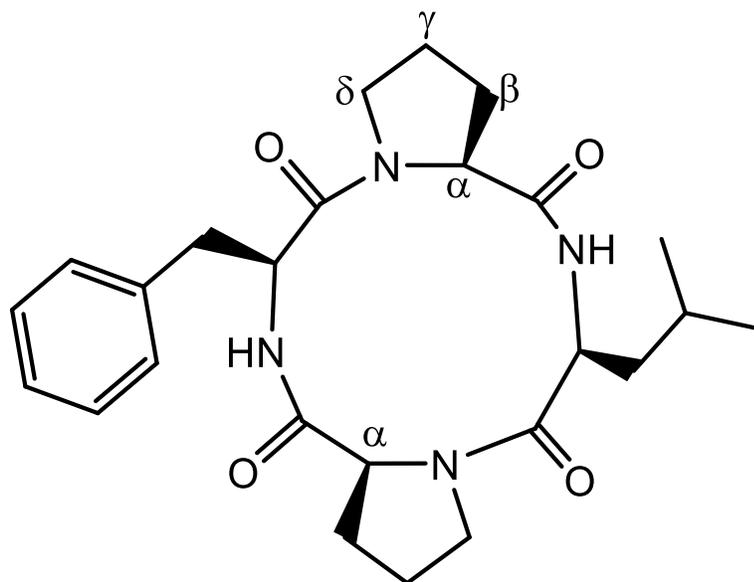


Figura 5.4 *ciclo-[L-Pro-L-Phe-L-Pro-L-Leu]* 5.1

La estructura propuesta para el compuesto **5.1** es la misma reportada para el tetrapéptido *ciclo-[L-Pro-L-Phe-L-Pro-L-Leu]*, producido por una la cepa de *Pseudomonas* sp., recuperada de la esponja *Halisarca ectofibrosa* recolectada en Okinawa, Japón [235]. Sin embargo, se encontraron algunas diferencias en el desplazamiento químico del protón α del residuo Pro-2 en δ_H 4.07 en el presente trabajo vs. δ_H 2,59 medido en metanol- d_4 reportado por Rungprom y colaboradores[235]. En la revision de literatura, se encontró que los desplazamientos característicos del proton α en residuos de L-Pro en ciclopéptidos se encuentra en el rango de 4.0 - 4.5 ppm [98], mientras que el protón α en residuos de D-Pro se han encontrado en δ_H 2.85 [236], lo cual confirma la presencia de dos residuos de L-prolina en el compuesto **5.1**. Apoyados en este análisis, proponemos que el compuesto presentado por Rungprom y colaboradores corresponde a *ciclo-[L-Pro-L-Phe-D-Pro-L-Leu]* y nosotros reportamos por primera vez los datos revisados para el compuesto *ciclo-[L-Pro-L-Phe-L-Pro-L-Leu]*.

5.2.2 Compuesto 5.2

El compuesto **5.2** (29.2 mg) fue aislado como un sólido blanco, con una rotación óptica de $[\alpha]^{23}_D + 0.31$ ($c = 0.1$, MeOH). En el espectro de masas se observó la presencia de un ión molecular protonado $[M+H]^+$ en m/z 455.2649 consistente con la fórmula molecular $C_{25}H_{35}N_4O_4$ (calculada para $C_{25}H_{35}N_4O_4$ $m/z = 455.2653 \Delta 1$ ppm).

En el espectro de RMN- 1H (400 MHz, metanol- d_4 , Tabla 5.2, Anexo 12) se observaron señales características de un anillo aromático monosustituido a δ_H 7.31-7.22 (5H, m), cuatro protones característicos de carbonos α de aminoácidos δ_H 4.45 (1H, dt, $J = 4.9, 1.9$ Hz), 4.20 (1H, dd, $J = 6.9, 1.9$ Hz), 4.09 (1H, dd, $J = 7.6, 1.9$ Hz) y 4.07 (1H, dd, $J = 9.6, 1.9$ Hz) sugiriendo que **5.2** es un péptido que contiene 4 residuos de aminoácidos. Adicionalmente, se observan señales para ocho metilenos en δ_H 3.56 (1H, m) - 3.50 (1H, m); δ_H 3.55 (1H, m) - 3.37 (1H, dd, $J = 12.3, 6.3$ Hz); δ_H 3.17 (2H, d, $J = 4.9$ Hz); δ_H 2.32 (1H, m) - δ_H 1.95 (1H, m); δ_H 2.11 (1H, m) - δ_H 1.23 (1H, m,); δ_H 2.07 (1H, m) - δ_H 1.99 (1H, m); δ_H 1.45 (1H, ddq, $J = 13.4, 7.5, 4.5$ Hz) - δ_H 1.33 (1H, ddq, $J = 13.4, 7.5, 2.4$ Hz) y δ_H 1.80 (2H, m), junto con un metino en δ_H 2.17 (1H, dddq, $J = 9.6, 7.0, 4.5, 2.4$ Hz), y dos grupos metilo en δ_H 1.07 (3H, d, $J = 7.0$ Hz) y δ_H 0.93 (3H, t, $J = 7.5$ Hz).

El espectro de RMN- ^{13}C (100 MHz, metanol- d_4 , Tabla 5.2, Anexo 13) presentó cuatro señales de carbono carboxílico características de amidas en δ_C 172.4, 170.9, 167.5 y 166.9, junto con cuatro metinos unidos a nitrógeno en δ_C 61.3, 60.1, 59.9 y 57.7 confirmando la presencia de cuatro residuos de aminoácidos. Adicionalmente, el espectro presentó un anillo aromático monosustituido con señales en δ_C 137.3, 131.0 (X2); 129.5 (X2) y 128.1; ocho metilenos en δ_C 46.2, 45.9, 38.2, 29.5, 29.3, 25.4, 23.3 y 22.7, un metino en δ_C 37.1 y dos carbonos característicos de grupo metilo en δ_C 15.5 y 12.5. Las señales de RMN del compuesto **5.2** mostraron ser similares a las reportadas previamente para el compuesto **5.1** y para otros tetrapéptidos cíclicos. Mediante el análisis de los espectros de RMN bidimensionales COSY, HMBC y HSQC (Anexos 14-16) se determinó que el compuesto **5.2** está formado por un residuo de fenilalanina, un residuo de isoleucina y dos residuos de prolina.

Tabla 5.2 Datos de RMN del compuesto 5.2 en metanol d_4 (RMN- ^1H a 400 MHz; RMN- ^{13}C a 100 MHz)

Residuo	Posición	δ ^1H , integr, mult, (J en Hz)	δ ^{13}C , mult.
Isoleucina	α	4.07, 1H, dd, (9.6, 1.9)	61.3, CH
	β	2.17, 1H, dddq, (9.6, 7.0, 4.5, 2.4)	37.1, CH
	γ	1.45 1H, ddq (13.4, 7.5, 4.5)	25.4, CH ₂
		1.33, 1H, ddq (13.4, 7.5, 2.4)	
	δ	0.93, 3H, t, 7.5	12.5, CH ₃
	β (CH ₃)	1.07, 3H, d, 7.0	15.5, CH ₃
	CO	-	167.5, C
	NH	ND*	
Prolina-1	α	4.20, 1H, dd, (6.9, 1.9)	60.1, CH
	β	2.32, 1H, m	29.5, CH ₂
		1.95, 1H, m	
	γ	2.07, 1H, m	23.3, CH ₂
		1.99, 1H, m	
	δ	3.56, 1H, m	45.9, CH ₂
		3.50, 1H, m	
CO	-	172.4, C	
Fenilalanina	α	4.45, 1H, dt, (4.9, 1.9)	57.7, CH
	β	3.17, 2H, d, (4.9)	38.2, CH ₂
	1		137.3, C
	2,4	7.31-7.22, 5H, m**	131.0 x 2, CH
	3,5	7.31-7.22, 5H, m**	129.5 x 2, CH
	6	7.31-7.22, 5H, m**	128.1, CH
	CO		166.9, C
	NH	7.91***	
Prolina 2	α	4.09, 1H, dd, (7.6, 1.9)	59.9, CH
	β	2.11, 1H, (m)	29.3, CH ₂
		1.23, 1H, (m)	
	γ	1.80, 2H, (m)	22.7, CH ₂
	δ	3.55, 1H, (m)	46.2, CH ₂
		3.37, 2H, dd, (12.3, 6.3)	
	CO	-	170.9

* ND No detectado

** Señales sobrelapadas para los cinco protones del anillo aromático.

*** Detectado en DMSO

La secuencia de aminoácidos fue determinada mediante el uso de correlaciones claves en el espectro de HMBC la cuales se presentan en la Figura 5.5. La unidad de Isoleucina (Ile) se encontró en medio de las dos unidades de prolina, por la correlacion del protón δ del residuo Prolina-1 (Pro-1) en δ_H 3.50 con el carboxilo del residuo Ile en δ_C 167.5, y por la correlación del protón en δ_H 4.07 asignado a la posición α de la Ile con el carbonilo en δ_C 170.9 asignado al residuo Prolina-2 (Pro-2). De otro lado, el residuo de fenilalanina (Phe) mostró estar unido al residuo Pro-2 por las correlaciones del protón α en δ_H 4,09 y del protón γ en δ_H 3.37 del residuo Pro-2 con el grupo carbonilo en δ_C 166.9 asignado a la fenilalanina. Al igual que con el compuesto anterior, el experimento de HMBC medido en DMSO- d_6 (Anexo 17), permitió observar correlaciones entre el protón NH del residuo Phe en δ_H 7.91 con el carbono carboxílico de la Phe en δ_C 166.9 y con el carbono δ_C 60.1 asignado a la Pro-1 (Figura 5.2), permitiendo así proponer una estructura cíclica para el compuesto **2**. De esta manera, la estructura plana del compuesto **5.2** fue establecida como *ciclo*-[Pro-Ile-Pro-Phe] (Figura 5.5).

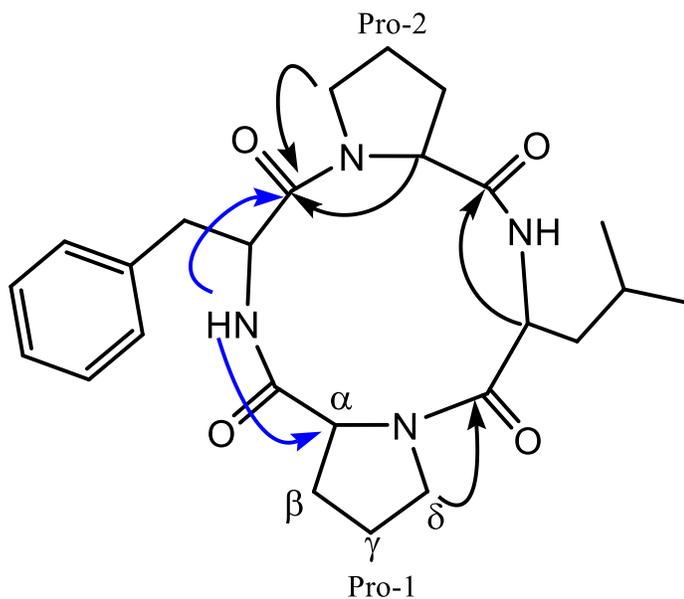


Figura 5.5 Correlaciones clave de HMBC para el compuesto 5.2 En azul se presentan las correlaciones observadas en el experimento medido en DMSO- d_6 y en negro las observadas en el experimento medido en metanol- d_4 .

La configuración absoluta de los aminoácidos del compuesto **5.2** se intentó determinar por la aplicación del método de Marfey, empleando como agente derivatizante el L-FDAA y D-FDAA

y patrones de los aminoácidos L-Pro, L-Ile y L-Phe, encontrando un pico cromatográfico con tiempo de retención 6.420 min y espectro UV idéntico al encontrado para la L-Prolina (Tr 5.630 min) Figura 5.6 lo cual indicó que ambos residuos de prolina tenían la configuración L. Si bien no se logró establecer la estereoquímica de los residuos de isoleucina y fenilalanina, los datos de RMN resultaron idénticos a los reportados para L-Phe y muy similares a los de la L-Leu en el compuesto 5.1 a partir de lo cual se estableció la estructura del compuesto 5.2 como se presenta en la Figura 5.7, el cual, hasta nuestro conocimiento no ha sido previamente reportado de fuentes naturales.

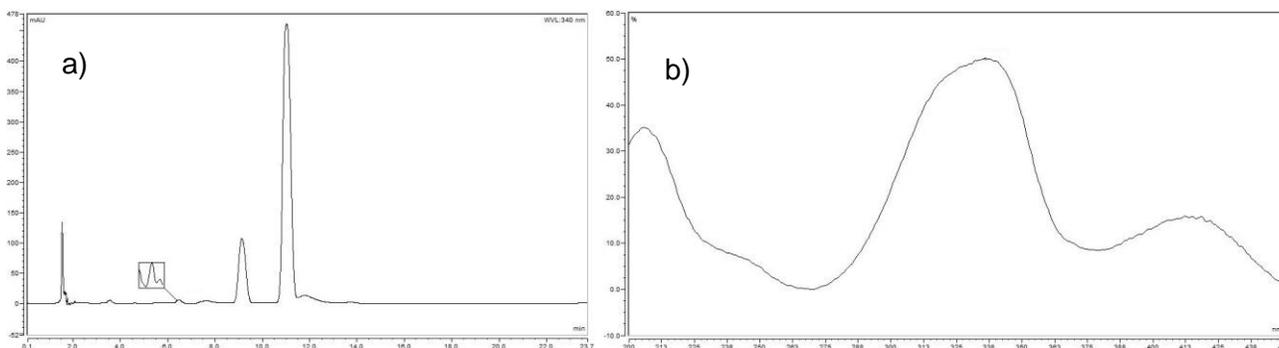


Figura 5.6 Cromatograma de los derivados en a y espectro UV del derivado de L-Pro en b del compuesto-5.2.

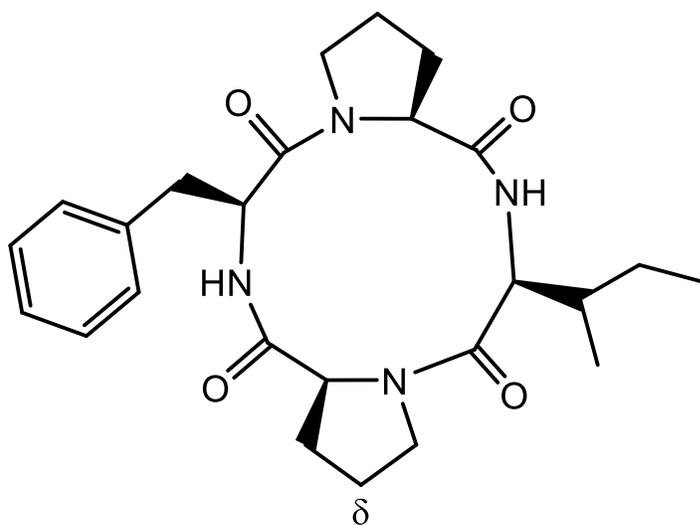


Figura 5.7 ciclo-[L-Pro-L-Phe-L-Pro-L-Ile] 5.2

5.2.3 Compuestos 5.3 y 5.4

El compuesto **5.3** (4.5 mg) fue aislado como un sólido amorfo blanco con rotación óptica de $[\alpha]^{23}_D +6.42$ ($c = 0.1$, MeOH). En el espectro de masas se observó un ión molecular protonado $[M+H]^+$, en m/z 245.1310 consistente con la fórmula molecular $C_{14}H_{17}N_2O_2$ (calculada para $C_{14}H_{17}N_2O_2$ $m/z = 245.1290$, Δ 8.1 ppm).

En el espectro de RMN- 1H (400 MHz, cloroformo- d_1 , Tabla 5.3, Anexo 18), se encontraron señales características de un péptido con un anillo aromático monosustituído en δ_H 7.31-7.22 (5H, m), dos metinos en δ_H 4.22 (1H, m), 3.02 (1H, m), junto con señales para cuatro metilenos en δ_H 3.65 (1H, m)- 3.40 (1H, m); δ_H 3.12 (1H, m)- 3.09 (1H, dd, $J = 13.6, 5.4$ Hz); δ_H 2.18 (1H, m)- 1.82 (1H, m) y δ_H 1.95 (1H, m) - 1.7 (1H, m). El espectro de RMN- ^{13}C (100 MHz, cloroformo- d_1 , Tabla 5.3, Anexo 19) presentó señales para dos carbonos carboxílicos características de grupo amida en δ_C 169.2 y 164.7, junto con dos grupos α -CH en δ_C 59.1 y 59.0, sugiriendo la presencia de dos residuos de aminoácidos. Adicionalmente, el espectro mostró un anillo aromático monosustituído con señales en δ_C 135.2, 130.0 (X2); 128.8(X2) y 127.5; cuatro metilenos en δ_C 45.1, 40.2, 28.9 y 21.6. Los datos antes descritos y el análisis de los espectros HMBC y HSQC (Anexos 20 y 21) permitieron identificar al compuesto **3** como la dicetopiperazina *ciclo*-[L-Phe-D-Pro] [237].

Tabla 5.2 Datos de RMN 1D de 5.3 y 5.4 en cloroformo- d_1 (RMN- 1H a 400 MHz; RMN- ^{13}C a 100 MHz)

Residuo	Posición	Compuesto 5.3		Compuesto 5.4	
		δ_H , integr, mult, (J en Hz)	δ_C mult.	δ_H , integr, mult, (J en Hz)	δ_C mult.
Fenilalanina	α	4.22, 1H, m	59.0, CH	4.27 1H, dd, (10.8, 3.1)	59.1, CH
	β	3.09, 1H, dd(13.6, 5.4)	40.2, CH ₂	3.59, 1H, m	45.4, CH ₂
		3.12, 1H,		2.80 1H, dd, (14.4, 10.8)	
	1		135.2, C		136.0, C
	2-6	7.31-7.22, 5H, m	130.0 x 2, CH	7.31-7.22, 5H, m	129.3 x 2, CH
			128.8 x 2, CH		129.1 x 2, CH
	CO		127.5, CH		127.5, CH
	NH	ND	164.7, CO		165.1, C

Prolina	α	3.02, 1H, m	57.1, CH	4.08 1H, t, (8.4)	56.3, CH
	β	2.18, 1H, m	28.9, CH ₂	2.34, 1H, m	28.3, CH ₂
		1.82, 1H, m		2.05, 1H, m	
	γ	1.95, 1H, m	21.6, CH ₂	2.04, 1H, m	22.5, CH ₂
		1.70, 1H, m		1.93, 1H, m	
	δ	3.65, 1H, m	45.1, CH ₂	3.67, 1H, m	36.7, CH ₂
		3.40, 1H, m		3.65, 1H, m	
CO	-	169.2, C		169.3, C	

El compuesto **5.4** (1.3 mg) fue aislado como un sólido amorfo blanco con rotación óptica de $[\alpha]^{23}_D -12.90$ ($c=0.129$, MeOH). En el espectro de masas se observó el ión molecular protonado $[M+H]^+$ en m/z de 245.1306, consistente con la fórmula molecular $C_{14}H_{17}N_2O_2$ (calculada para $C_{14}H_{17}N_2O_2$ $m/z = 245.1290$, Δ 6.5 ppm).

En el espectro de RMN-¹H (400 MHz, cloroformo-*d*₁, Tabla 5.3 Anexo 22), se encontraron señales muy similares a las del compuesto **5.3**, con un anillo aromático monosustituido δ_H 7.31-7.22 (5H, m), dos protones α en δ_H 4.27 (1H, dd, $J=10.8, 3.1$ Hz) y 4.08 (1H, t, $J=8.4$ Hz); señales para cuatro metilenos en δ_H 3.67 (1H, m)- 3.65 (1H, m); δ_H 3.59 (1H, m) - 2.80 (1H, dd, $J=14.4, 10.8$ Hz); δ_H 2.34 (1H, m) - 2.05 (1H, m) y δ_H 2.04 (1H, m) - 1.93 (1H, m).

El espectro de RMN-¹³C (100 MHz, cloroformo-*d*₁, Tabla 5.3 Anexo 23) presentó dos señales de carbonos carboxílicos en δ_C 169.3 y 165.1, junto con dos grupos α -CH en δ_C 59.1 y 56.3, además de las señales de un anillo aromático monosustituido en δ_C 136.0, 129.3 (X2); 129.1 (X2) y 127.5; junto con señales para cuatro metilenos en δ_C 45.4, 36.7, 28.3 y 22.5. Con el análisis de los espectros de HMBC y HSQC (Anexos 24, 25) se identificó al compuesto **5.4** como otro de los posibles estereoisómeros de *ciclo*-[Phe-Pro]. Los datos espectroscópicos en RMN y EM arriba descritos para el compuesto **5.4** coinciden con los descritos para la dicetopoperazina *ciclo*-[L-Pro-L-Phe] [235], [237], [238]. Este tipo de compuestos se han reportado en esponjas marinas y su microflora asociada. Se ha descrito también su actividad antimicrobiana, antiviral, antitumoral y como estimulante de crecimiento vegetal [235], [237], [238].

La asignación de la configuración absoluta para los residuos de prolina y fenilalanina de los compuestos **5.3** y **5.4** se realizó por comparación con los datos de RMN -¹H de los compuestos **5.1** y **5.2** donde se observa la presencia de una D-Pro en el compuesto 3 y una L-Pro en el

compuesto 4, lo cual se pudo corroborar por la comparación de los datos de RMN de 5.3 y 5.4 con los datos reportados por Kalinovskaya y colaboradores [239]. De esta manera los datos de RMN del compuesto 5.3 coinciden con los de *ciclo*-[L-Phe-D-Pro] y los de compuesto 5.4 coinciden con los de *ciclo*-[L-Phe-L-Pro], cuyas estructuras se presentan en la Figura 5.8

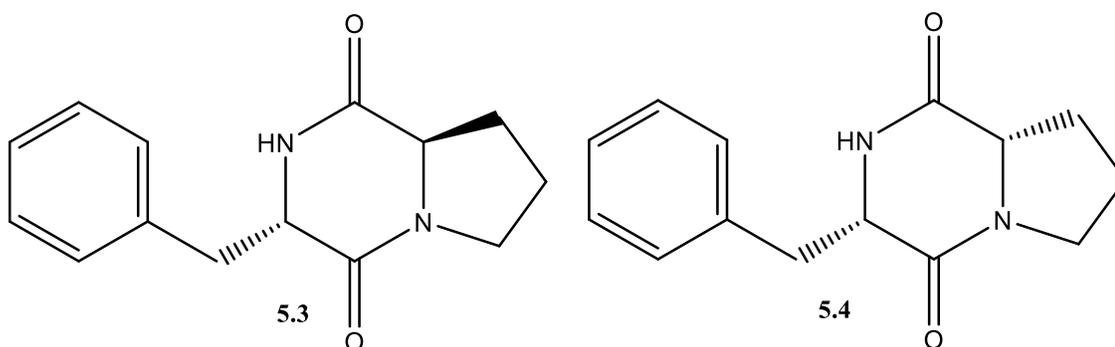


Figura 5.8 *ciclo*-[L-Phe-D-Pro] 5.3 y *ciclo*-[L-Phe-L-Pro] 5.4

5.2.4 Compuestos 5.5 a 5.7

El compuesto 5.5 (5.4 mg) fue aislado como un sólido amorfo blanco con rotación óptica de $[\alpha]^{23}_D -98.6$ ($c = 0.02$, MeOH). En el espectro de masas se observó un ión molecular protonado $[M+H]^+$, en m/z 211.1440 consistente con la fórmula molecular $C_{11}H_{18}N_2O_2$ (calculada por $C_{14}H_{19}N_2O_2$ $m/z = 211.1442$, Δ 3 ppm). El espectro de RMN- 1H (400 MHz, metanol- d_4), Anexo 26), se observan dos señales para protones característicos de carbonos en la posición alfa de un aminoácido δ_H 4.21 (1H, t, $J = 7.2$ Hz), 4.04 (1H, t, $J = 2.2$ Hz), sugiriendo que 5.5 contiene dos residuos de aminoácidos. Adicionalmente, se observan señales para cuatro metilenos en δ_H 3.52 (2H, m); δ_H 2.82 (1H, t, $J = 6.8$ Hz)- δ_H 2.49 (1H, m); δ_H 2.03 (2H, ddd, $J = 10.2, 7.3, 4.2$ Hz) y δ_H 1.98 (2H, m) y un metino en δ_H 1.94 (1H, m). Finalmente, se observan dos señales características de metilos geminales en δ_H 1.09 (3H, t, $J = 7.3$ Hz) y δ_H 0.93 (3H, t, $J = 6.9$ Hz).

Los datos espectroscópicos en RMN, EM y la rotación óptica arriba descritos coinciden con los reportados para la ciclo-[L-Pro-L-Leu] (Figura 5.3) [239]. La producción de la dicetopiperazina ciclo-[L-Pro-L-Leu] ha sido reportada previamente en bacterias como: *Streptomyces* sp. KH-61 (aislada de suelo, Suwon, Korea), *Pseudomonas putida*, *Lactobacillus plantarum* y *Achromobacter xylosoxidans*. La actividad antibacteriana para este compuesto ha sido

reportada contra cepas de los microorganismos *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* [240]-[244].

El compuesto **5.6** (4.4 mg) fue aislado como un sólido amorfo blanco. Su rotación óptica mostró un valor de $[\alpha]^{23}_D -74.9$ ($c = 0.1$, MeOH). En el espectro de masas se observó la presencia de un ion en $m/z=181.0988$ consistente con la pérdida $[M-SMe]^+$, que corresponde con la fórmula molecular $C_9H_{13}N_2O_2$ (calculada por $C_9H_{13}N_2O_2$ $m/z = 181.0977$, $\Delta 6.0$ ppm). En el espectro de RMN- 1H (400 MHz, cloroformo- d_1 , Anexo 27), se observó una señal característica de un protón NH de amida en $\delta_H 7.27$ (s), dos señales para protones característicos de carbonos en la posición alfa de un aminoácido en $\delta_H 4.21$ (1H, t, $J = 7.5$ Hz), 4.10 (1H, t, $J = 7.9$ Hz), sugiriendo que **5.6** contiene dos residuos de aminoácidos. Adicionalmente, señales para cinco metilenos en $\delta_H 3.53$ (2H, m); $\delta_H 2.69$ (2H, td, $J = 7.5, 2.5$ Hz); $\delta_H 2.36$ (1H, m) - $\delta_H 2.32$ (2H, m); $\delta_H 2.02$ (2H, m) y $\delta_H 1.98$ (1H, m). Finalmente, se observó un singlete, característico de un grupo metilo unido a un heteroátomo en $\delta_H 2.11$ (3H, s). El espectro de RMN- ^{13}C (100 MHz, cloroformo- d_1 , Anexo 28) y HMBC (Anexo 29) presentó señales para una dicetopiperazina con una señal en $\delta_C 15.3$ característica de un grupo metilo unido a un átomo de azufre. los datos espectroscópicos y la rotación óptica del compuesto **5.6** mostraron ser idénticos a los reportados para la *ciclo-[L-Pro-L-Met]* (Figura 5.3), previamente aislada de *Pseudomonas aeruginosa* [245].

El compuesto **5.7** (10 mg) fue aislado como un sólido amorfo blanco con rotación óptica de $[\alpha]^{23}_D -11.8$ ($c = 0.1$, MeOH). En el espectro de masas se observó la presencia de un ión molecular protonado $[M+H]^+$ en $m/z 261.1234$, consistente con la fórmula molecular $C_{14}H_{16}N_2O_3$ (calculada por $C_{14}H_{16}N_2O_3$ $m/z = 261.1234$, $\Delta 0.0$ ppm). En el espectro de RMN- 1H (400 MHz, cloroformo- d_1 , Anexo 30), se observaron dos señales para protones característicos de carbonos en la posición alfa de un aminoácido $\delta_H 4.21$ (1H, dd, $J = 10.0, 2.8$ Hz), $\delta_H 4.09$ (2H, t, $J = 7.7$ Hz), sugiriendo que **5.7** es una dicetopiperazina compuesta de tirosina por las señales de un anillo aromático *p*-disustituido en $\delta_H 7.05$ (2H, d, $J = 8.4$ Hz) y 6.78 (2H, d, $J = 8.4$ Hz) y una prolina con señales para cuatro metilenos en $\delta_H 3.68$ (1H, m)- 3.52 (1H, m); $\delta_H 3.46$ (1H, dd, $J = 14.5, 3.9$ Hz), $\delta_H 2.76$ (1H, dd, $J = 14.5, 10.0$ Hz), 2.33 (1H, dt, $J = 9.5, 5.1$ Hz) y $\delta_H 2.05$ (1H, m) - 1.84 (1H, m).

En el espectro de HMBC (cloroformo- d_1 , Anexo 31) los dos protones α de los aminoácidos en $\delta_C 58.4$ (CH) y 56.4 (CH) presentaron correlaciones con los dos carbonos carboxílicos

característicos de grupo amida a δ_c 169.3 y 165.4. Además, se observaron las correlaciones características de un anillo aromático *p*-disustituido con señales en δ_c 156.11, δ_c 130.7 (X2), δ_c 126.7 y δ_c 114.78 (X2) y cuatro metilenos en δ_c 44.6, 36.2, 27.8 y 21.3. Los datos anteriores mostraron ser idénticos a los reportados para la *ciclo*-[Tyr-Pro]; como se menciono anteriormente tras una revisión en la literatura de los desplazamientos típicos de protones α en ciclopéptidos con residuos aromáticos para residuos con configuración *L* se encuentra entre 4.0-4.5 ppm, lo cual concuerda con los datos aquí reportados para ambos residuos, indicando que ambos residuos tienen configuración *L* [246] (Figura 5.9).

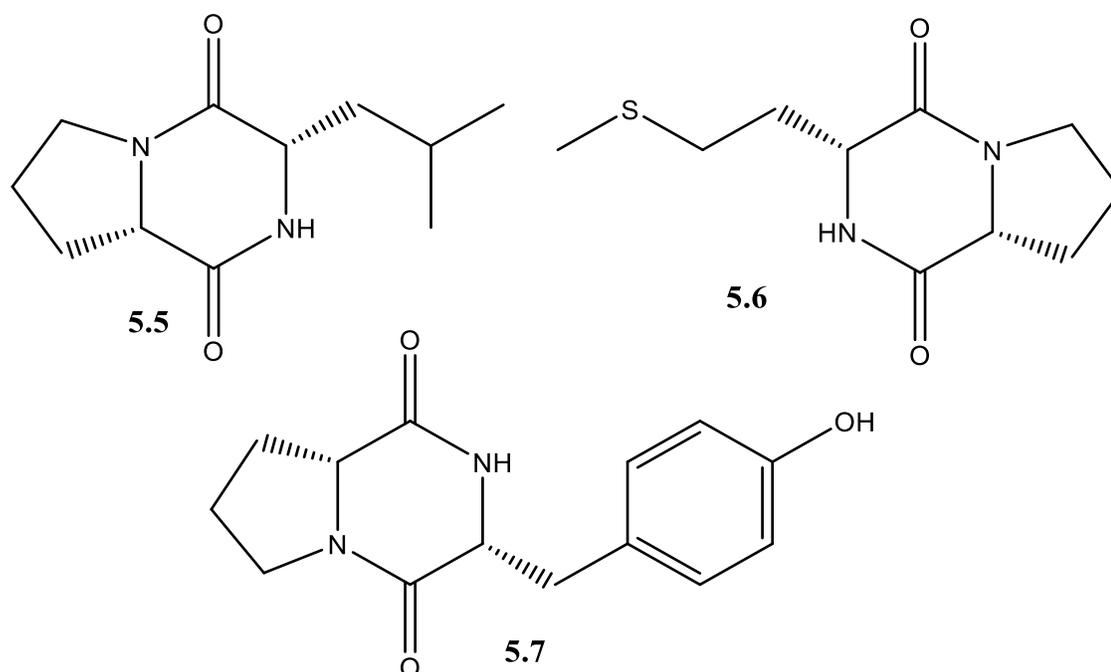


Figura 5.9 Estructuras de los compuestos 5.5 – 5.7

5.2.5 Evaluación de actividad antimicrobiana contra fitopatógenos

Los resultados de la evaluación de la concentración mínima inhibitoria para los compuestos 1-7 contra frente a *B. glumae* y *B. gladioli* se presentan en la tabla 5.3. Los compuestos 5.1 y 5.2 presentaron la mejor actividad antimicrobiana contra ambas bacterias fitopatógenas con valores de MIC de 1.1 mM frente a *B. glumae*. La mayor actividad observada en el ensayo fue la mostrada por el compuesto 5.1 frente a *B. gladioli* con una MIC de 0.068 mM. Sin embargo, el compuesto 5.2 mostró ser no activo frente a esta misma bacteria. Otro resultado interesante

es la actividad selectiva del compuesto **5.5** contra la bacteria *B. gladioli* con una MIC de 0.29 mM. Los otros compuestos evaluados mostraron actividades moderadas con valores entre 1.8 y 2.19 mM y solo el compuesto **5.7** mostró ser no activo en las condiciones ensayadas.

Adicionalmente, los compuestos **5.1** y **5.2** fueron evaluados contra el hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloesporioides* en el ensayo de microdilución en caldo, donde se observó que el compuesto **5.2** redujo en un 50% la supervivencia celular de los conidios del hongo a una concentración de 1.1 mM y el compuesto **5.1** logró una reducción de la supervivencia del 65% aproximadamente al ser ensayado a esta misma concentración.

Tabla 5.3 Concentración mínima inhibitoria (MIC) de los compuestos 5.1 – 5.7.

Compuesto	MIC (mM) <i>B. glumae</i>	MIC (mM) <i>B. gladioli</i>
5.1	1.1	0.068
5.2	1.1	NA
5.3	2.04	2.04
5.4	2.04	2.04
5.5	2.37	0.29
5.6	2.19	2.19
5.7	NA	NA
Control (-) (MeOH 10%)	NA	NA
Gentamicina 20 µg/mL (+)	< 4.1x10 ⁻⁵	< 4.1x10 ⁻⁵

Los péptidos marinos han mostrado tener un amplio rango de actividades biológicas que incluyen actividades como antimicrobiana, antitumoral, antiviral, anticoagulante, antioxidante, entre otras [247]–[250]. Como se mencionó anteriormente, la estructura del compuesto **5.1** está relacionada con el péptido ciclo-(Phe-Pro-Leu-Pro), producido por una cepa de *Pseudoalteromonas* sp. Este péptido había mostrado actividad contra *S. aureus*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *E. coli* y *V. anguillarum* [251].

Es de resaltar que este compuesto presenta actividad antibacteriana contra *B. gladioli* de manera selectiva ya que muestra una MIC dos órdenes de magnitud más pequeña que los demás compuestos que fueron activos contra este fitopatógeno. Reportes en la literatura sobre el potencial biológico de los ciclooligopéptidos, sugieren que aquellos que contienen dos unidades de prolina, poseen gran potencial citotóxico y que la disposición alternada de dos

unidades de prolina en una estructura cíclica podría estar relacionada con la bioactividad de los mismos [226].

Respecto a las dicetopiperazinas, estas presentan un espectro de actividad bastante similar entre ellas mismas; el compuesto *ciclo*-[L-Prolina-L-Leucina] **5.5** presenta una actividad selectiva contra *B. gladioli* al tener un valor de MIC un orden de magnitud menor que los demás compuestos aquí evaluados. En la revisión de literatura, este compuesto mostró inhibir de la producción de aflatoxinas en el hongo *Aspergillus parasiticus* [252] y actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas como *B. subtilis* y *S. aureus*, además de ser activo contra fitopatógenos del arroz como *Pyricularia oryzae*. Así mismo, el compuesto **5.6** ha mostrado tener actividad antimicrobiana contra las bacterias *B. subtilis* y *S. aureus*, con valores de MIC del orden de 64 y 32 µg/mL. También ha presentado actividad antifúngica contra los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia solani*, *Penicillium expansum*, and *F. oxysporum* [253]. Así, tanto los tetrapéptidos como las dicetopiperazinas aquí aisladas mostraron ser los responsables de la actividad observada para el extracto de *Streptomyces* sp PNM161a en los capítulos anteriores.

5.3 Conclusiones

A partir del extracto orgánico del aislamiento *Streptomyces* sp. PNM-161a cultivado en medio LB se logró el aislamiento y la identificación de siete compuestos entre ellos dos tetrapéptidos cíclicos y cinco dipéptidos cíclicos pertenecientes a las dicetopiperazinas (DKPs). Los compuestos fueron identificados como *ciclo*-[L-Phe-L-Pro-L-Leu-L-Pro] **5.1**, *ciclo*-[L-Phe-L-Pro-L-Ile-L-Pro] **5.2**, *ciclo*-[L-Phe-D-Pro] **5.3**, y *ciclo*-[L-Phe-L-Pro] **5.4**, *ciclo*-[L-Pro-L-Leu] **5.5**, *ciclo*-[L-Pro-L-Met] **5.6** y *ciclo*-[L-Tyr-L-Pro] **5.7**. La estructura de compuestos fue elucidada por RMN mono y bidimensional, MS y por comparación con los datos reportados en literatura. La configuración absoluta de los tetrapéptidos se determinó mediante el método de Marfey y la comparación de sus datos de RMN contra los reportados para los L- y D- isómeros.

La evaluación de la actividad para el control de los fitopatógenos mostró que los compuestos más activos fueron el péptido **5.1** (*B. gladioli* MIC = 0.068 mM; *B. glumae* MIC = 1.1 mM) y la dicetopiperazina *ciclo*-[L-Pro-L-Leu] compuesto **5** (*B. gladioli* MIC = 0.3 mM; *B. glumae* MIC = 2.4 mM), y **5.2** (*B. glumae* MIC = 1.1 mM), además de otros compuestos con actividad

moderada, permitiendo así determinar cuales eran los compuestos responsables de la actividad observada en el extracto orgánico del aislamiento *Streptomyces* sp. PNM-161a. Adicionalmente, los compuestos **5.1** y **5.2** mostraron actividad contra el hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* logrando valores de inhibición de la esporulación del 65% y del 50%, respectivamente.

5.4 Materiales y métodos

5.4.1 General

Los espectros de RMN ^1H , ^{13}C y 2D fueron adquiridos en un espectrómetro Bruker Advance 400 (400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C) usando cloroformo- d_1 , metanol- d_4 y DMSO- d_6 como solventes y las señales residuales de solventes fueron usadas como estándar interno. Los datos de masas de alta resolución fueron adquiridos en un espectrometro de masas Accurate-Mass (q-TOF) (Agilent Technologies) en modo positivo usando ionización por electrospray ESI como fuente de iones. El nebulizador trabajó a 50 (psi) usando un flujo de gas 10 L/min a temperatura de 350°C. El fragmentador trabajó a 175 V y el *skimmer* a 75 V con un V_{pp} de 750 V. La cromatografía en columna (CC) fue llevada a cabo bajo vacío usando silica gel 60 (70-230 Macherey-Nagel). Los análisis de HPLC-ELSD se realizaron en un equipo Thermo Dionex ultimate 3000, acoplado a un detector ELSD Sedex 85 (Sedere, France) con una ganancia de 10 y una temperatura de 80°C para el detector ELSD. La determinación de la rotación óptica fue hecha en un polarímetro Polartronic E, Schmidt + Haensch equipado con una celda de 1 mL y 5 cm de longitud. Para la lectura de los ensayos de actividad antibacteriana en placas de 96 pozos se usó un lector de placas de ELISA AccuReader Metertech (Taipei, Taiwan) leyendo a una longitud de onda de 600 nm. Todos los solventes usados fueron grado HPLC.

5.4.2 Fermentación de la cepa y extracción

Streptomyces sp. PNM-161a fue originalmente aislada de una muestra de *Bryopsis* sp. [4]. La secuencia del gen 16S rRNA para esta cepa fue depositada en GenBank/EMBL/DDBJ, bajo el número de acceso KX641396 [158].

El aislamiento se recuperó de su stock a -80°C y fue cultivado en cajas de Petri con el medio ISP-2 a una temperatura de 28°C por una semana. Para la obtención del extracto orgánico se realizó un cultivo líquido en dos pasos así: el inóculo inicial de *Streptomyces* sp. PNM-161a fue un cultivo primario de 100 mL en medio Luria-Bertani (LB) en un erlenmeyer de 500 mL con agitación a 130 rpm a 25°C durante cinco días. El medio LB contiene por litro 5 g de extracto de levadura, 10 g NaCl, 10 g triptosa, ajustando el pH a 7.2 usando NaOH 3N. Estos 100 mL de pre-cultivo fueron transferidos a un matraz de 5 L conteniendo 900 mL de medio LB (utilizando 40 matraces para un total de 40 L de cultivo), agitados a 130 rpm a 25°C durante diez días. La biomasa de cada matraz fue removida por centrifugación a 5000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante fue extraído tres veces con acetato de etilo (1:1). Las fases orgánicas de los 40 matraces del cultivo fueron reunidas y luego evaporadas a presión reducida obteniendo 3.0 g de extracto crudo.

5.4.3 Aislamiento de los compuestos

El extracto crudo fue fraccionado usando un cartucho de extracción en fase sólida (SPE) (Phenomenex Strata C-18, 5 g, 20 mL) con un gradiente discontinuo de MeOH/ H_2O , 10%, 30%, 50%, 70% y 100% MeOH (cada una de 30 mL) para obtener 5 fracciones F1-F5. La fracción F4 (860 mg) eluída con la fase de composición del 70% de MeOH presentó actividad antimicrobiana, y fue separada por cromatografía en columna en sílica gel 60 usando un gradiente discontinuo desde 100% CHCl_3 a 100% MeOH, para obtener 170 fracciones de 10 mL agrupadas en 11 fracciones F4.1-F4.11 por sus perfiles en cromatografía en capa delgada.

De la fracción F4.1 (eluída con 100% CHCl_3) se obtuvo el compuesto **5.1** (138 mg). La fracción F4.2 (430 mg, eluída con CHCl_3 : MeOH 98:2) fue sometida a separación con HPLC usando una columna Kromasil C8 (10 x 250 mm, 10 μm) con un gradiente isocrático de acetonitrilo (MeCN) 15% y agua 85% de (2 mL/min) para obtener los compuestos **5.1** (280 mg), **5.2** (29.2 mg), una mezcla de los compuestos **5.3** y **5.4** (30 mg) y el compuesto **5.5** (5.4 mg)

La fracción F4.3 (51 mg), eluída con CHCl_3 /MeOH (96:4) fue también separada por HPLC con una columna Kromasil C8 (10 x 250 mm, 10 μm) y eluída con un gradiente de MeCN (A) y H_2O (B) así: 10% de A con un incremento lineal hasta 25% en 20 min, luego 10 min a 25% de A, seguido por un incremento lineal hasta 30% de A en 10 min, luego un incremento lineal hasta

50% de A en 10 min, luego un incremento lineal hasta 100% de A en 3 minutos y después 3 min al 100% de A, a un flujo de 2 mL / min para obtener los compuestos **5.3** (4.5 mg), **5.4** (1.3 mg) y **5.6** (4.4 mg). La fracción F4.4 (59 mg, eluída con CHCl₃: MeOH 94:6) fue fraccionada por HPLC preparativo usando una columna Kromasil C8 (10 x 250 mm, 10 µm) y un flujo de 2.0 mL/min. La fase móvil consistió en ACN (A) y H₂O (B). El programa de elución comenzó con un 5% de A seguido de un incremento lineal hasta 25% de A en 30 min, luego otro incremento lineal hasta 70% de A en 3 min seguido por 5 min a 70% de A. Este fraccionamiento permitió obtener el compuesto **5.7** (10 mg) (Figura 5.1).

5.4.4 Determinación de la configuración absoluta de aminoácidos por el método de Marfey

Para determinar la configuración absoluta de los aminoácidos que conforman los compuestos **5.1** y **5.2** se prepararon disoluciones 50 mM de cada uno de los L-aminoácidos (prolina, leucina, isoleucina y fenilalanina). A 50 µL de la disolución de patrones de cada aminoácido, se le adicionaron 100 µL de una disolución de L-FDAA (1-Fluoro-2,4-dinitrofenil-5-L-alaninamida) en acetona al 1% y 20 µL de una disolución NaHCO₃ 1M. La mezcla obtenida se calentó durante 1 hora a 50°C y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Luego se adicionaron 10 µL de una disolución de HCl 2M. El producto obtenido se secó utilizando NaOH y el residuo se disolvió en 1 mL de DMSO. Este protocolo fue realizado nuevamente usando D-FDAA (1-Fluoro-2,4-dinitrofenil-5-D-alaninamida). Los análisis por HPLC fueron realizados usando una columna ODS C18 Hypersil (150 X 4.6 mm, 5µ). La fase móvil consistió un sistema de elución en gradiente con acetonitrilo y ácido fórmico 0,01M que inició con 23% MeCN y terminó con 50 % de MeCN en un tiempo de 30 minutos y se mantuvo así por 10 min; flujo 1.0 mL/min; 25°C; detección UV a 340 nm. El análisis del compuesto 5.1 se realizó en un cromatógrafo HPLC Agilent Technologies 1260 acoplado a un detector DAD y el análisis del compuesto 5.2 se realizó en un cromatógrafo UHPLC Thermo Dionex ultimate 3000 acoplado a un detector DAD

Para la hidrólisis se mezclaron 1 mg del compuesto a analizar y 1 mL de una disolución de HCl 6M. Se calentó la mezcla de reacción durante 24 horas a 150°C. La mezcla obtenida se secó usando NaOH sólido y el residuo fue disuelto en agua. 100 µL de la disolución resultante fueron derivatizados usando 200 µL de una disolución del reactivo de Marfey en acetona al 1%. El

compuesto **5.1** y **5.2** fueron derivatizados con L-FDAA y con D-FDAA. La mezcla obtenida se calentó durante 24 horas a 50°C, se enfrió hasta temperatura ambiente y se agregaron 20 µL de HCl 2M. La disolución obtenida fue llevada a un volumen de 1 mL usando una mezcla de ácido fórmico 0.01M y acetonitrilo (23:77). A la mezcla se le realizó un análisis por HPLC empleando las mismas condiciones del experimento anterior. Los tiempos de retención y los espectros UV de los picos cromatográficos observados fueron comparados con los tiempos de retención de los derivados de los aminoácidos obtenidos previamente. La implementación del método fue realizada por Lady Yohanna Sepúlveda Sánchez como parte de su trabajo de grado en Química.

5.4.5 Ensayos de actividad antimicrobiana

Para determinar la actividad antimicrobiana de las fracciones y los compuestos aislados de PNM-161a, contra las bacterias fitopatógenas *B. glumae* (ATCC 33617) y *B. gladioli* (3704-1-FEDEARROZ), se realizó un ensayo de actividad antimicrobiana en placas de 96 pozos usando el método de dilución en caldo [195]. Brevemente, 190 µL de medio líquido KB y 10 µL de cada bacteria (Absorbancia λ 600 nm = 0,25) fueron cultivados en cada pozo. 200 µL de las fracciones F1 - F5 (2 mg/mL), previamente disueltos en metanol 10%, fueron aplicados en la primera línea vertical de la placa. Se hicieron diluciones seriadas para obtener cinco concentraciones diferentes en cada pozo: 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62.5 µg/mL y 32.25 µg/mL. 20 µL del extracto orgánico de acetato de etilo del blanco de medio de cultivo y 10 µL de gentamicina (20 µg/mL) fueron usados como control negativo y positivo, respectivamente. El mismo procedimiento fue aplicado para la evaluación de la actividad antibacteriana para los compuestos puros, evaluando las siguientes concentraciones: 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62.5 µg/mL, 32.25 µg/mL, 16.12 µg/mL y 8.1 µg/mL. El mismo extracto del medio de cultivo (20 µL) y 10 µL de gentamicina (20 µg/mL) fueron usados como controles negativo y positivo, respectivamente. Las placas fueron incubadas a 37°C por 24h, la inhibición del crecimiento fue medida por su absorbancia a λ =600 nm [195].

Para los ensayos de actividad antifúngica, fueron evaluados los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi* raza 2, aislado de tejido vascular de plantas silvestres de clavel sintomáticas [254] y *Colletotrichum gloeosporioides* 26B, obtenido de plantas de ñame con síntomas clásicos de antracnosis. Estos hongos fitopatógenos fueron suministrados

amablemente el grupo de investigación “Estudio de Actividades Metabólicas Vegetales” del departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia y por el “Grupo de Estudio en Ñame” del instituto de Biotecnología, respectivamente.

Estos hongos fueron inoculados en el medio RPMI-1640. Para la evaluación de la actividad antifúngica, los compuestos puros fueron evaluados a las siguientes concentraciones: 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62.5 µg/mL, 32.25 µg/mL, 16.12 µg/mL y 8.1 µg/mL. La actividad antifúngica fue evaluada para los compuestos **5.1**, **5.2** y **5.3** usando una modificación del método aumentando el número de diluciones. El volumen medio por pozo fue de 100 µL. Todos los compuestos evaluados fueron disueltos previamente en una solución de metanol al 10% en agua, estos fueron aplicados en la primera línea vertical de la placa. La suspensión de cada hongo fitopatógeno (10 µL) fue añadida a la placa de 96 pozos. 20 µL de la solución de metanol al 10% y una solución de clotrimazol al 1% (5 µL/pozo) fueron usados como control negativo y positivo, respectivamente. Las placas fueron incubadas a 25°C por 48h, la inhibición del crecimiento fue medida por la absorbancia a $\lambda=600$ nm.

La concentración mínima inhibitoria (MIC) fue determinada como la concentración más baja que inhibe el crecimiento visible de los fitopatógenos. La inhibición del crecimiento de cada dilución fue calculada usando la siguiente ecuación: %inhibición: $100 \times [1 - \text{OD del pozo tratado} / \text{OD del control negativo}]$, donde OD se entiende como densidad óptica del pozo a $\lambda=600$ nm.

6. *Streptomyces* sp. PNM-208 como fuente de antimicinas con actividad antifúngica contra *Colletotrichum gloeosporioides*

6.1 Introducción

La cepa *Streptomyces* sp. PNM-208, fue obtenida de una muestra del octocoral *Eunicea fusca* recolectado en Providencia, mar Caribe colombiano [158]. Esta cepa fue seleccionada para estudiar su producción de metabolitos teniendo en cuenta los resultados de la estrategia de integración presentada en el capítulo 4. *Streptomyces* sp. PNM-208, agrupó de acuerdo a su taxonomía en el OTU 1 (capítulo 2) y el análisis filogenético indicó que los vecinos cercanos de esta cepa son *Streptomyces griseochromogenes*, *S. violascens*, *S. resistomycificus*, *S. exfoliatus* y *S. albidoflavus*, todos ellos con un 99.86% de similitud. *Streptomyces* sp. PNM-208 mostró ser de gran interés por presentar el perfil metabólico más diverso entre las 24 cepas evaluadas de acuerdo a los datos del HCA (Figura 4.1) y el *barcoding* químico (Figura 4.2). Además, su extracto orgánico presenta actividad antimicrobiana contra el fitopatógeno *C. gloeosporioides* (Figura 3.4). A continuación, se presenta el aislamiento e identificación de 8 compuestos y la evaluación de su actividad antifúngica frente al hongo fitopatógeno *C. gloeosporioides*.

6.2 Resultados y discusión

Con el objetivo de identificar los compuestos responsables de la actividad biológica de *Streptomyces* sp. PNM-208, este aislamiento fue cultivado en medio líquido LB (40 L), los cuales fueron extraídos con acetato de etilo y fraccionados por RP-SPE (Figura 6.1). La fracción F5 (100% MeOH), fue seleccionada para continuar con su proceso de aislamiento y purificación debido a su actividad antimicrobiana.

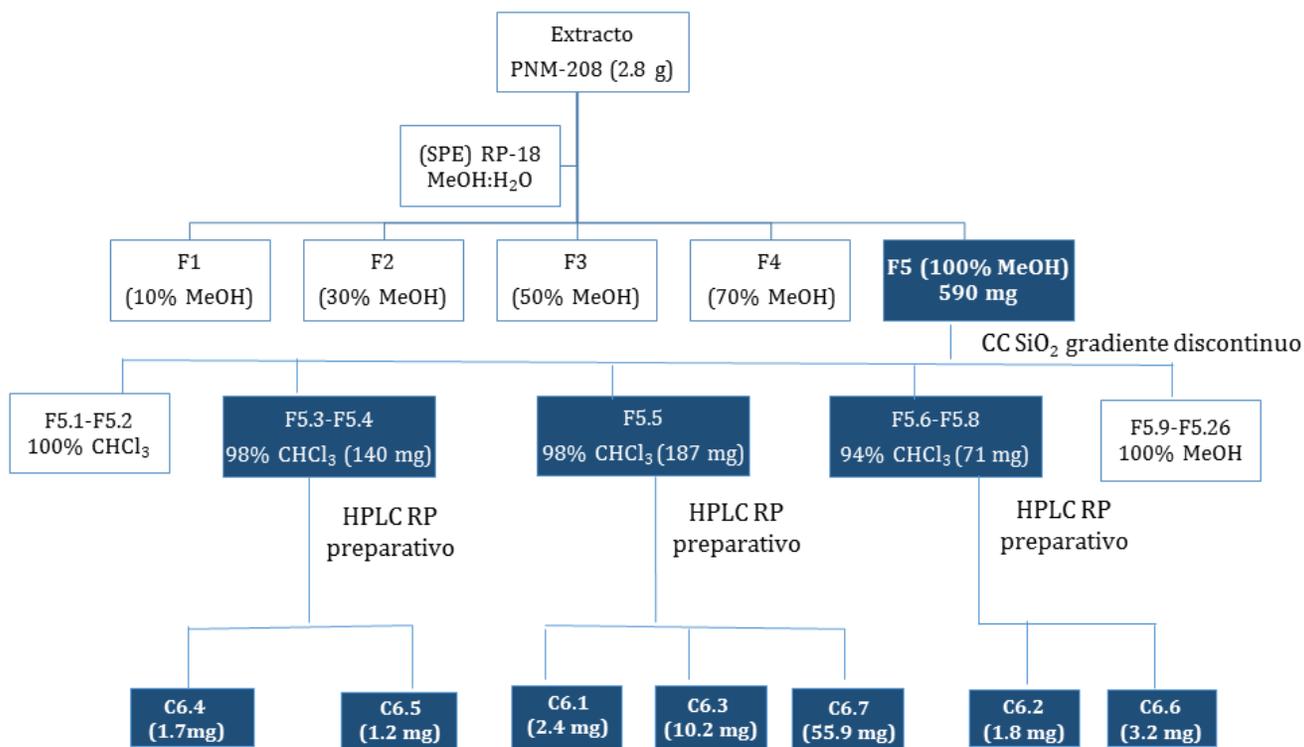


Figura 6.1 Esquema de fraccionamiento del extracto orgánico obtenido de *Streptomyces* sp. PNM-208

6.2.1 Identificación de compuestos

6.2.1.1 Compuestos 6.1 a 6.3

El compuesto **6.1** (2.4 mg) fue aislado como un sólido amorfo amarillo. En el espectro de masas se observó la presencia de un ión molecular protonado $[M+H]^+$, en m/z 451.2079 (EI HRMS), consistente con la fórmula molecular $C_{22}H_{30}N_2O_8$. (calculada para $C_{22}H_{31}N_2O_8$ m/z = 451.2075, Δ 0.8 ppm). En el espectro de RMN- 1H (600 MHz, cloroformo- d_1 , Tabla 6.1 Anexo 32), se observó una señal en δ_H 12.6 (1H, s) correspondiente al proton de un hidroxilo fenólico quelatado; señales para un anillo aromático 1,2,3-trisustituido en δ_H 8.55 (1H, dd, J = 8.1, 1.2 Hz); 6.92 (1H, t, J = 8.1) y 7.25 (1H, dd, J = 8.1, 1.2 Hz), dos señales para protones NH de amida en δ_H 7.12 (1H, d, J = 8.1 Hz) y 7.95 (1H, s); un proton de grupo formamida en δ_H 8.50 (1H, d, J = 1.2). Señales para cuatro protones sobre carbonos enlazados a heteroátomos en δ_H 5.71 (1H, q, J = 7.0 Hz), 5.26 (1H, t, J = 7.7 Hz), 4.89 (1H, m) y 3.60 (1H, t, J = 9.0 Hz). También se observan señales para dos metinos alifáticos en δ_H 2.52 (1H, ddd, J = 9.7, 6.8, 3.0 Hz) y 1.37 (1H, m), un metileno diasterotópico en δ_H 1.83 (1H, dt, J = 12.5, 3.2 Hz) - 1.51 (1H, m), un metileno en δ_H 1.25 (2H, brs) y cuatro metilos en δ_H 1.48 (3H, d, J = 6.3 Hz), 1.33 (3H, d, J = 6.6), 0.88 (3H, d, J = 7.2 Hz), 0.85 (3H, d, J = 6.4 Hz).

En el espectro de RMN- ^{13}C (150 MHz, cloroformo- d_1 , Tabla 6.2 Anexo 33), se observaron señales para cuatro carboxilos de ester y/o amida en δ_C 174.0, 170.1, 169.3 y 158.7, junto con las señales de un anillo aromático en δ_C 150.1, 127.3, 124.7, 120.2, 119.1, 112.5. Se observaron tres carbonos unidos a oxígeno en δ_C 77.1, 76.7 y 70.7, junto con una señal para un carbono unido a nitrógeno en δ_C 53.7. Las otras señales observadas correspondieron a metinos alifáticos en δ_C 49.9 y 32.4; dos metilenos alifáticos en δ_C 35.7 y 30.5 y cuatro metilos en δ_C 18.5, 18.4, 15.1 y 11.4.

El análisis de los experimentos COSY y HMBC (Anexo 34, 35) permitió identificar que el compuesto **6.1** tiene el núcleo básico de una antimicina con un anillo central dilactónico de nueve miembros, similar al presentado por las urauchimicinas, las cuales se caracterizan por no presentar grupos acilo en la posición 8 y variaciones en la longitud de la cadena alquímica en la posición 7. Las señales asignadas a una cadena alquímica de cinco átomos de carbono con terminación ante iso (δ_C 35.7, 32.4, 30.5, 11.4, 18.4) permitieron identificar al compuesto **6.1**

como la urauchimicina A (Figura 6.2)[255], previamente aislada de una cepa identificada como *Streptomyces* sp. Ni-80 (recuperada de una muestra de esponja no identificada, cala Urauchi, isla Iriomote, Japón) [256].

El compuesto **6.2** (1.8 mg) fue aislado como un sólido amarillo amorfo mostró señales en RMN-¹H (600 MHz, cloroformo-*d*₁, Tabla 6.1 Anexo 36) y RMN-¹³C (150 MHz, cloroformo-*d*₁, Tabla 6.2, Anexo 37), similares a las presentadas por el compuesto **6.1**, indicando que se trataba de otra antimicina. Las diferencias entre los dos espectros fueron asignadas a la presencia de un grupo etilo como cadena alquílica en la posición 7, con señales en δ_{H} 1.80-1.60 (2H, m); δ_{C} 22.3 y δ_{H} 0.96 (3H, t); δ_{C} 11.6. En el espectro de masas se observó un ión molecular protonado [M+H]⁺, en m/z 409.1612 consistente con la fórmula molecular C₁₉H₂₄N₂O₈ (calculada para C₁₉H₂₅N₂O₈ m/z = 409.1606, Δ 1.4 ppm). Estos datos permitieron identificar al compuesto **6.2** como la urauchimicina C (Figura 6.2) [257], previamente reportada en el extracto de una cepa identificada como *Streptomyces* sp. B1751 (recuperada de sedimentos provenientes del noreste de las Islas Shetland, Escocia).

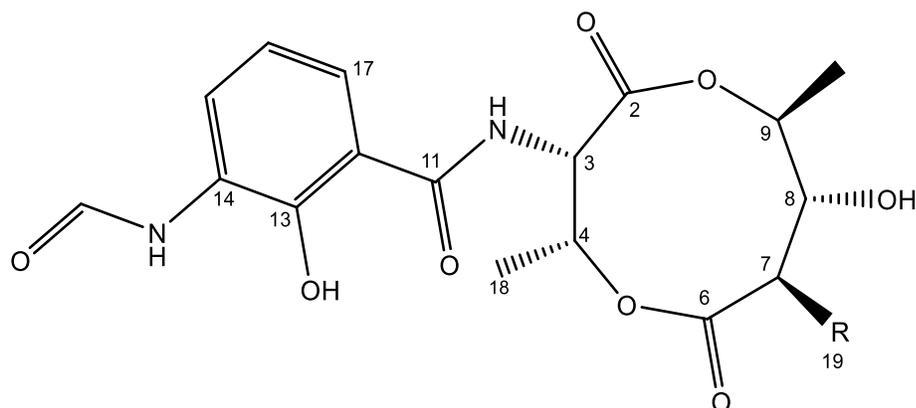
De manera análoga, el compuesto **6.3** (10 mg) mostró en RMN-¹H (600 MHz, cloroformo-*d*₁, Tabla 6.1 Anexo 38) y HMBC (600 MHz, cloroformo-*d*₁, Tabla 6.2 Anexo 39), señales casi idénticas a las de los compuestos **6.1** y **6.2** indicando que se trataba de otra antimicina con el OH de la posición 8 libre. Las diferencias entre los espectros fueron nuevamente observadas en las señales de la cadena alquílica en la posición 7, la cual tenía cuatro señales características de una cadena alifática correspondiente a un grupo n-butilo incluyendo las de los carbonos de la parte terminal en δ_{C} 22.4 y 13.9. En el espectro de masas se observó un ión molecular protonado [M+H]⁺, en m/z 437.1909 consistente con la fórmula molecular C₂₁H₂₈N₂O₈, (calculada para C₂₁H₂₉N₂O₈ m/z =437.1919, Δ 2.2 ppm), confirmando que la cadena alifática era de cuatro carbonos, lo cual, finalmente permitió la identificación del compuesto **6.3** como la deisovalerilblastmicina, compuesto producido por una cepa identificada como *Streptomyces* sp. 514-A1 (recuperada de una muestra de suelo del Bosque Moiwa, Sapporo, Japón) [258] y por la cepa marina *Streptomyces* sp. B1751 (recuperada de sedimentos provenientes del noreste de las Islas Shetland, Escocia) .

Tabla 6.1 Datos de RMN-¹H de 6.1, 6.2 y 6.3 en cloroformo-*d*₁ (RMN-¹H a 600 MHz)

Posición	δ ¹ H, integr, mult, (J en Hz)			Referencia		
	6.1	6.2	6.3	Urauchimicina A	Urauchimicina C	Deisovalerilblastmicina
2						
3	5.26, 1H, t (7.7)	5.28, 1H, t (7.6)	5.24, 1H, t (7.6)	5.24	5.25, t (7)	5.25, 1H, t (7)
4	5.71, 1H, q (7.0)	5.73, 1H dt (13.6, 6.7)	5.70, 1H, dt (13.5, 6.7)	5.69	5.71 quint (7)	5.70, 1H, quint (7)
6						
7	2.52, 1H, ddd (9.7, 6.8, 3.0)	2.32, 1H, d (3.2)	2.36, 1H, ddd (11.5, 9.8, 3.1)	2.49	2.31, d (7)	2.36, 1H, dt (10, 4)
8	3.60, 1H, t (9.0)	3.63, 1H, t (9.6)	3.62, 1H, t (10)	2.59	3.61, t (10)	3.60, 1H, t (10)
9	4.89, 1H, m	4.89, 1H, td (12.6, 6.3)	4.89, 1H, ddd, (12.6, 9.6, 6.3)	4.88	4.95-4.80 m	4.92-4.82, 1H, m
9-CH ₃	1.48, 3H, d (6.3)	1.48, 3H, d (6.3)	1.46, 3H, d (6.3)	1.45	1.46, d (6)	1.46, 3H, d (6)
10 (NH)	7.12, 1H, d (8.1)	7.14, 1H, d (7.8)	7.12, 1H, d (7.6)	7.09	7.10, d (7)	7.09, 1H, d (7)
11						
12						
13						
13-(OH)	12.67, 1H, s	12.69, 1H, s	12.70, 1H, s	12.63	12.65, s	12.65, 1H, s
14						
14-(NH)	7.95, 1H, s	7.96, 1H, s	7.96, 1H, s	7.90	7.93, s	7.92, 1H, s
14 (NHCHO)	8.50, 1H, d (1.2)	8.53, 1H, d, (1.2)	8.53, 1H, d, (1.2)	8.49	8.51, d (1)	8.50, 1H, d (1)
15	8.55, 1H, dd (8.1, 1.2)	8.57, 1H, dd (8.0, 1.2)	8.57, 1H, dd, (8.0, 1.2)	8.55	8.55, dd (8, 1)	8.55, 1H, d (8)
16	6.92, 1H, t (8.1)	6.95, 1H, t, (8.1)	6.95, 1H, t, (8.1)	6.92	6.93, t (8)	6.92, 1H, t (8)
17	7.25, dd (8.1, 1.2)	7.25-7.22, d (1.2)	7.25-7.22, d, (1.3)	7.24	7.25-7.22, m	7.25-7.22, 1H, m
18	1.33, 3H, d (6.6)	1.33, 3H, d, (6.7)	1.32, 3H, d, (6.7)	1.30	1.31, d (7)	1.31, 3H, d (7)
19	1.51 1H, m, 1.83 1H, dt (J = 12.5, 3.2 Hz)	1.80-1.60, 2H, m	1.46-, 2H, d, (6.3)	1.51-1.84	1.80-1.60, m	1.70-1.60, 2H, m
20	1.37, 1H, m	0.96, 3H, t, (7.4)	1.24 2H, m	1.32	0.94, t (7)	1.30-1.27, 2H, m
21	1.25, 2H sb		1.27, 1H, m	1.27		1.34-1.28, 2H, m
22	0.88, 3H, d (7.2)		0.92, 3H, t (7.1)	0.89		0.90, 3H, t (7)
23	0.85, 3H, d, (6.4)			0.86		

Tabla 6.2 Tabla Datos de RMN-¹³C de 6.1, 6.2 y 6.3 en cloroformo-*d*₁ (RMN-¹H a 150 MHz)

	$\delta^{13}\text{C}$ mult.			Referencia	
	6.1	6.2	6.3	Urauchimicina A	Urauchimicina C
2	170.1, C	170.1, C	170.1, C	170.1	170.1
3	53.7, CH	53.9, CH	53.9, CH	53.8	53.7
4	70.7, CH	70.7, CH	70.7, CH	70.7	70.7
6	174.0, C	173.8, C	174.0, C	173.8	173.8
7	49.9, CH	53.7, CH	45.6, CH	50.0	53.7
8	77.1, CH	77.3., CH	79.2, CH	77.1	77.3
9	76.7, CH	76.5, CH	76.3, CH	76.3	77.0
9-CH₃	18.5, CH ₃	18.3, CH ₃	18.4, CH ₃	18.5	18.3
10 (NH)					
11	169.3, C	169.4, C	169.6, C	169.4	169.4
12	112.5, C	112.9, C	112.5, C	112.6	112.6
13	150.1, C	150.4, C	150.8, C	150.6	150.6
13-(OH)					
14	127.3, C	127.2, C	127.6, C	127.4	127.4
14-(NH)					
14 (NHCHO)	158.7, CH	159.1, CH	159.0, CH	158.9	159.1
15	124.7, CH	124.7, CH	125.1, CH	124.8	124.8
16	119.1 CH	119.0, CH	119.0, CH	119.0	119.0
17	120.2, CH	120.1, CH	120.2, CH	120.1	120.2
18	15.1, CH ₃	15.1, CH ₃	15.0, CH ₃	15.0	15.0
19	35.7, CH ₂	22.1, CH ₂	24.7, CH ₂	35.8	22.1
20	32.4, CH	11.5, CH ₃	29.2, CH ₂	32.4	11.6
21	30.5, CH ₂		22.4, CH ₂	30.5	
22	11.4, CH ₃		13.9, CH ₃	11.3	
23	18.4, CH ₃			18.4	



Compuesto 6.1 R= 2-Metilbutilo

Compuesto 6.2 R= Etilo

Compuesto 6.3 R= Butilo

Figura 6.2 Estructura de los compuestos 6.1 a 6.3

Es de resaltar que los compuestos **6.1-6.3** cuentan con cinco centros asimétricos, los cuales por comparación con sus desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C concuerdan con la configuración previamente establecida (*3R*, *4R*, *7R*, *8S* y *9S*). Esta configuración la han logrado establecer a través de diferentes aproximaciones dentro de las cuales se encuentran el dicroísmo circular, el método modificado de Mosher y la cristalografía de rayos X. [259], [260].

6.2.1.2 Compuestos 6.4 a 6.7

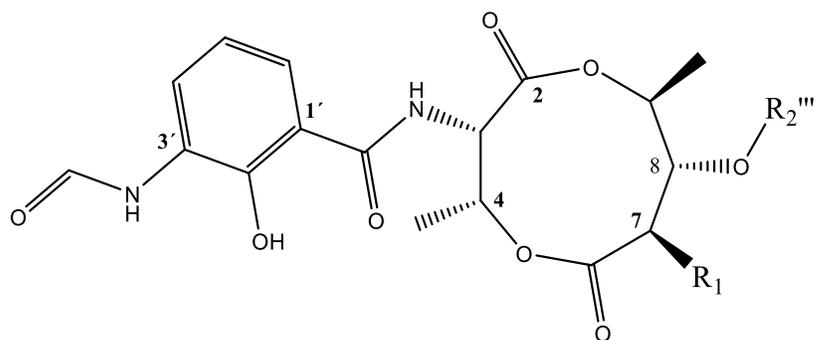
La fracción F5.3 obtenida por cromatografía en columna permitió aislar los compuestos **6.4** a **6.7** por HPLC en fase reversa, cuya elucidación estructural se presenta a continuación.

El compuesto **6.4** (1.7 mg) se aisló como un sólido amorfo blanco, en el espectro de masas mostró un ión molecular protonado $[\text{M}+\text{H}]^+$, en m/z 479.2036 consistente con la fórmula molecular $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_9$. (calculada para $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_9$ $m/z = 479.2024$, Δ 2.5 ppm). En RMN- ^1H (600 MHz, cloroformo- d_1 , Tabla 6.3 Anexo 40) y RMN- ^{13}C (150 MHz, cloroformo- d_1 , Tabla 6.4 Anexo 41), se observaron señales similares a las presentadas por el compuesto **6.1**, indicando que se trataba de otra antimicina. Sin embargo, se observaron diferencias como el desplazamiento de las señales del protón y carbono en la posición 8 de δ_{H} 3.60 (1H, t 9.0); δ_{C} 77.1 a δ_{H} 5.10 (1H, t, $J=10$); δ_{C} 75.2 indicando la esterificación en esta posición, así como la aparición de señales de un grupo 2-metilpropanoato en δ_{C} 175.6 ($\text{C}1''$); δ_{H} 2.62 (1H, sp, $J = 7.0$), δ_{C} 34.2 (CH, $\text{C}2''$); δ_{H} 1.20 (3H, d, $J = 7.0$), δ_{C} 19.3 (CH_3 , $\text{C}3''$); δ_{H} 1.20 (3H, t, $J = 7.0$), δ_{C}

18.9 (CH₃, C4''). Estos datos junto con el análisis de los experimentos COSY y HMBC (Anexo 42, 43), permitieron identificar al compuesto **6.4** como la antimicina A_{6a} (Figura 6.3) [261]. Hasta nuestro conocimiento los datos de RMN para este compuesto no habían sido previamente reportados en literatura y su identificación había sido realizada con base en los datos de espectrometría de masas.

De manera análoga, el compuesto **6.5** (1.2 mg) en el espectro de masas presentó un ión molecular protonado [M+H]⁺, en *m/z* 493.2183 consistente con la fórmula molecular C₂₄H₃₂N₂O₉ (calculada para C₂₄H₃₃N₂O₉ *m/z* = 493.2181, Δ 0.4 ppm) (Anexo 44), en RMN-¹H (600 MHz, cloroformo-*d*₁, Tabla 6.3 Anexo 45), HSQC y HMBC (Tabla 6.4 Anexo 46, 47), mostró ser una mezcla de dos antimicinas isómeras aciladas en la posición 8; una de ellas con un grupo 2-metilbutirato con señales en δ_c 175.6 (C1''), δ_H 2.44 (1H, dd, *J* = 14, 6.8 Hz); δ_c 41.3 (CH, C2''), δ_H 1.75 (1H, m) - 1.48 (1H, m); δ_c 26.5 (CH₂, C3''), δ_H 0,89 (3H, t, *J* = 7.4); δ_c 11.5 (CH₃, C4''); δ_H 1.19 (3H, t, *J* = 7.0); δ_c 16.5 (CH₃, C5'') y el componente b con un grupo 3-metilbutirato por las señales δ_c 176.2 (C1''); δ_H 2.37 (2H, t, *J* = 7.3 Hz), δ_c 43.0 (CH₂, C2''); δ_H 2.19 (1H, m), δ_c 25.3 (CH, C3''); δ_H 0.99 (3H, d, *J* = 6.6), δ_c 22.3 (CH₃, C4''); δ_H 0.99 (3H, d, *J* = 6.6), δ_c 22.3 (CH₃, C5'').

La cadena alquílica en la posición 7 mostró señales características de un grupo etilo en δ_H 1.71 (1H, m) - 1.41 (1H, m), δ_c 21.6, (CH₂, C1''); δ_H 0.90 (3H, dd, *J* = 9.3, 5.5 Hz), δ_c 11.5 (CH₃, C2''), permitiendo la identificación de la mezcla de las antimicinas A_{5a} compuesto **6.5a** y A_{5b} compuesto **6.5b** [261] (Figura 6.3). Vale la pena mencionar que la mayoría de veces que se reportan las antimicinas aciladas, estas aparecen como mezclas de compuestos que tienen los grupos 2-metilbutirato y 3-metilbutirato enlazados al hidroxilo de la posición 8. Hasta nuestro conocimiento los datos de RMN para la mezcla de estos compuestos no habían sido previamente reportados en literatura y su identificación había sido realizada con base en los datos de espectrometría de masas.



R₁ **R₂** (componente a) **R₂** (componente b)

Compuesto 6.4 etilo isobutirato

Compuesto 6.5 etilo 2-metilbutirato 3-metilbutirato

Figura 6.3 Estructura de los compuestos 6.4 y 6.5

Tabla 6.3 Datos de RMN-¹H de 6.4 y 6.5 en cloroformo-*d*₁ (RMN-¹H a 600 MHz)

Posición	δ ¹ H, integr, mult, (<i>J</i> en Hz)		Referencia		
	6.4	6.5	Antimicina A ₁₀	Antimicina A ₄	Antimicina A ₃
3	5.27, 1H, t (7,7)	5.27, 1H, t (7.6)	5.27 (t, 7.6)	5.29 (t, 7.7)	5.32 (t, 7.7)
4	5.73, 1H, dt (13.5, 6.8)	5.74, 1H dt (13.4, 6.6)	5.72 (q, 7.0)	5.73 (p, 6.9)	5.74 (p, 6.8)
7	2.49, 1H dt (11.4, 3.1)	2.47, 1H, dd, (12.7, 5.7)	2.52 m	2.53 m	2.52 m
8	5.10, 1H, t (10)	5.1, 1H, t (10)	5.08 (t, 9.7)	5.08 m	5.11 (t, 9.9)
9	5.01, 1H, m	5.0, 1H, m	4.98 m	4.98 m	4.99 m
4-CH ₃	1.33, 3H, d (6.7)	1.33, 3H, d (6.7)	1.30 (d, 6.7)	1.30, d (6.7)	1.30 (d, 6.7)
9-CH ₃	1.30, 3H, d (6.3)	1.30, 3H, d (6.8)	1.27 (d, 6.4)	1.28, d (6.1)	1.28 (d, 6.3)
4'	8.56, 1H, d (7.7)	8.57, 1H, d (7.9)	8.53 (d, 7.9)	8.54, d (8.1)	8.53 (d, 8.0)
5'	6.93, 1H, t (8.1)	6.93, 1H, t (8.1)	6.91 (t, 7.8)	6.91, t (8.1)	6.90 (t, 8.1)
6'	7.25, 1H, d (8.1)	7.25 dd, (12.7, 5.7)	7.22 (d, 8.1)	7.23, d (8.2)	7.23, d (8.2)
1''	1.72, 1H, m	1.71, 1H, m	1.66 m	1.72 m	1.68 m
	1.44, 1H, m	1.41, 1H, m	1.23 m	1.25 m	1.24 m
2''	0.90, 3H, t (7.4)	0.90, 3H, t (7.2)	1.23	1.25 m	1.24 m
3''			1.23 m	1.25 m	1.24 m
4''			1.23 m	0.86, t (7.0)	0.85, t
5			1.23 m		
6			0.81 (t, 6.4)		
7			0.80 (d, 5.8)		

1'-CONH	7.08, d (7.6)	7.09, d (7.9)	7.05 (d, 6.4)	7.05, d (7.7)	7.08 d (7.7)
2'-OH	12.67, s	12.66, s	12.6 s	12.59 s	12.59 s
3'NHCHO	7.93, s	7.94, s	7.92 (br s)	7.92 bs	8.02 bs
3'NHCHO	8.52, 1H, d (1.4)	8.51, 1H, d, (1.4)	8.49 s	8.49, d (1.5)	8.50 d (1.7)
Componente a					
2'''	2.62, 1H, sp (7.0)	2.44, 1H, dd, (14, 6.8)	2.40 m	2.34, t (7.3)	2.41 m
3'''	1.20, 3H, d (7.0)	1.75, 1H, m 1.48, 1H, m	1.71 m 1.48 m	1.68, m	1.75 m 1.48 m
4'''	1.20, 3H, d (7.0)	0.89, 3H, t (7.4)	0.93, t (7.3)	0.98, t (7.4)	0.94, t (7.5)
5'''		1.19, 3H, d (7.0)	1.17, d (6.4)		1.17, d (7.0)
Componente b					
2'''		2.37, 2H, t (7.3)	2.24, d (6.7)	2.60 m	2.24, d (6.6)
3'''		2.19, 1H, m	2.13 m	1.21 d (6.9)	2.13 m
4'''		0.99, 3H, d (6.6)	0.97, d (6.4)	1.20 d (6.9)	0.98, d (6.6)
5'''		0.99, 3H, d (6.6)	0.97, d (6.4)		0.98, d (6.6)

Tabla 6.4 Datos de RMN ¹³C de 6.4 y 6.5 en cloroformo-*d*₁ (RMN-¹³C a 150 MHz)

Posición	$\delta^{13}\text{C}$ mult		Referencia		
	6.4	6.5	Antimicina A ₁₀	Antimicina A ₄	Antimicina A ₃
2	170.1, C	170.1, C	170.07	170.11	170.10
3	53.6, CH	53.0, CH	53.67	53.70	53.66
4	70.9, CH	70.9, CH	70.91	70.91	70.91
6	172.9, C	172.6 C	172.93	172.89	172.93
7	51.7, CH	51.7, CH	50.12	50.14	50.11
8	75.2, CH	75.2, CH	75.29	75.36	75.31
9	74.8, CH	74.8, CH	74.90	74.93	74.92
4-CH ₃	15.0, CH ₃	15.2, CH ₃	14.97	14.97	14.96
9-CH ₃	17.8, CH ₃	17.8, CH ₃	17.85	17.80	17.81
1'	112.5, C	112.6, C	112.54	112.63	112.64
2'	150.6, C	150.6, C	150.64	150.66	150.64
3'	127.4, C	127.4, C	127.41	127.51	127.52
4'	124.8, CH	124.8, CH	124.84	124.85	128.82
5'	118.9 CH	119.0, CH	119.00	119.00	118.95
6'	120.1, CH	120.0, CH	120.09	120.06	120.08
HC=O	159.0, CH	159.1, CH	159.08	158.92	159.06
1'- CONH	169.4, C	169.3, C	169.39	169.43	169.38
1''	21.7, CH ₂	21.6, CH ₂	28.64	28.04	28.14
2''	11.5, CH ₃	11.5, CH ₃	24.46	22.38	22.4
3''	30.5, CH ₂		36.09	29.21	29.16
4''			34.03	13.72	13.69
5''			29.46		
6''			11.37		
7''			18.99		
Componente a					
1'''	175.6, C	175.6, C	175.19	171.63	175.21
2'''	34.2, CH	41.3, CH	41.26	36.10	41.23
3'''	19.3, CH ₃	26.5, CH ₂	26.4	18.37	25.47
4'''	18.9, CH ₃	11.5, CH ₃	11.71	13.68	22.38
5'''		16.5, CH ₃	16.74		22.38
Componente b					
1'''		176.2, C	171.44	175.53	171.66
2'''		43.0, CH ₂	43.23	34.15	43.23
3'''		25.3, CH	25.48	18.93	25.47
4'''		22.3, CH ₃	22.42	18.94	22.38
5'''		22.3, CH ₃	22.42		22.38

Las primeras antimicinas fueron identificadas en 1949 a partir del *Streptomyces* sp. NRRL 2288 (aislado en suelo), debido a su actividad antifúngica. A la fecha se han reportado 46 antimicinas de origen natural aisladas de diferentes cepas de *Streptomyces* spp. Obtenidas tanto de ambientes terrestres como marinos [7]. En particular, se ha demostrado que las antimicinas tienen propiedades antifúngicas, insecticidas, nematocidas y piscicidas [259], [262]–[264].

Adicionalmente, se les ha reportado actividad anticancerígena y anti-inflamatoria [259], [265]. Una de las funciones que se les atribuye a las antimicinas, es su capacidad de inhibir directamente la actividad de las proteínas relacionadas con Bcl-2, un importante regulador de la muerte y supervivencia celular [262]. En algunos estudios se ha demostrado que la actividad biológica es altamente dependiente de los sustituyentes del anillo dilactónico y de la estructura de los mismos [257], [266].

Aunque inicialmente se estimó que la antimicina A era un único compuesto, trabajos posteriores mostraron que podía separarse en cuatro componentes activos relacionados, las antimicinas A₁-A₄ las cuales únicamente difieren en los sustituyentes 7 y 8 del anillo dilactónico, en la antimicina A₁ la posición 7 se encuentra sustituida con un grupo n-hexilo y en 8 acilada con un grupo isovalerato; la antimicina A₂, por otro lado posee también un grupo n-hexilo en 7 y en 8 acilada con un grupo n-butilato; la antimicina A₃ está sustituida con un grupo butilo en 7 y se encuentra acilada en 8 con el grupo isovalerato; finalmente, la antimicina A₄ con un grupo n-butilo en 7 y un grupo butirato en la posición 8 [261], [267], [268]. Los análisis espectroscópicos por NMR y la separación por HPLC, indicaron que cada una de las antimicinas A₁-A₄ correspondía a una mezcla de dos isómeros de posición en 8. En análisis posteriores realizados a esta mezcla de compuestos, mostró la presencia de dos compuestos minoritarios, las antimicinas A₅ y A₆. Las antimicinas A₇ y A₈ son producidas por *Streptomyces* sp. SC2221 (aislado de suelo, montaña Danda, condado de Nantou, Taiwán) y al igual que las antimicinas A₁-A₄ se presentan como una mezcla de isómeros. Posteriormente se aisló la antimicina A₉ a partir del cultivo líquido de *Streptomyces* sp. K01-0031 (suelo de montaña, Chuxiong, provincia de Yunnan, China). Este compuesto contiene un grupo acilo aromático a diferencia de las antimicinas reportadas hasta ese momento (con grupos alquilo y acilo de cadena lineal o ramificada).

Adicionalmente a los compuestos previamente descritos, apoyados en los datos de RMN mono y bidimensionales (Anexo 48-49) y la comparación con los datos de literatura se logró la identificación de la Brevinamida F (compuesto 6.6, 3 mg) [269] y la dicetopiperazina ciclo-[Phe-Pro] (compuesto 6.7, 55 mg) [235], [237], [238] Figura 6.4.

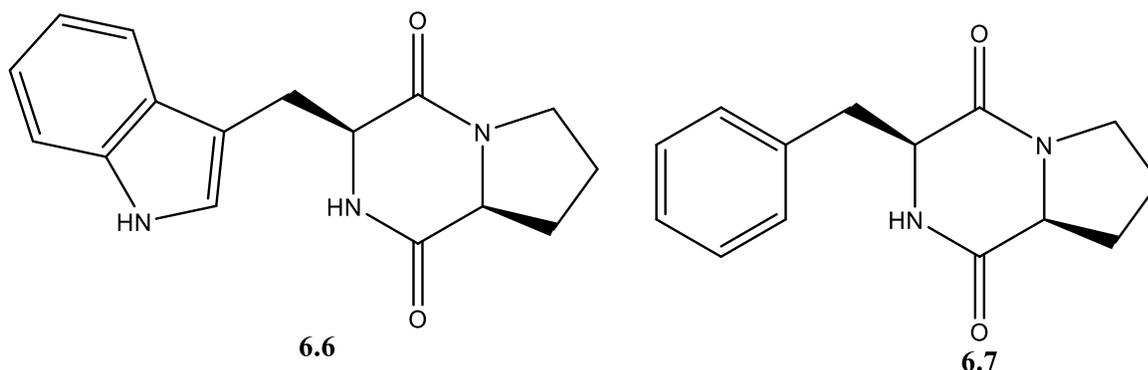


Figura 6.4 Estructura de los compuestos 6.6 y 6.7

6.2.2 Evaluación de la actividad antifúngica *contra Colletotrichum gloeosporioides*

Las antimicinas se han reportado como metabolitos bioactivos, y se ha demostrado que esta familia de compuestos tiene propiedades biológicas las cuales son dependientes de los sustituyentes del anillo dilactónico y de la estructura de los mismos.

Los resultados de evaluación de la actividad antifúngica de los compuestos **6.1 - 6.7** contra la cepa *C. gloeosporioides* fitopatógena del ñame se presentan en la Figura 6.5. Los tres primeros compuestos **6.1 a 6.3** son antimicinas con hidroxilo libre en la posición 8, los dos siguientes **6.4 y 6.5** pertenecen a las antimicinas aciladas en 8 y los dos últimos compuestos **6.6 y 6.7** son dos dicetopiperazines. Los resultados mostraron que los compuestos **6.1 - 6.5** presentaron actividad antifúngica contra el hongo fitopatógeno *C. gloeosporioides* con un porcentaje de germinación entre 0 y 3 % en la mayoría de los casos. Sólo el compuesto **6.2** presentó algunas conidias en estado de germinación con un porcentaje alrededor del 50%. De otro lado las dicetopiperazines no mostraron inhibir la germinación de conidios en el ensayo realizado. Algunos estudios de relación estructura actividad (REA) han determinado que tanto la longitud de las cadenas laterales en C7 como la acilación del grupo 8-OH en el anillo dilactónico, modulan la potente actividad antifúngica, antiviral y antitumoral, donde la presencia de cadenas largas en la posición C7 y la acilación del 8-OH mejoran la actividad biológica presentada, lo cual explica la poca actividad mostrada por el compuesto **6.2**, el cual tiene el OH en la posición 8 libre y la cadena alquímica en la posición 7 mas corta dentro de las antimicinas aquí asialdas. De otro lado, se estableció que la actividad antibacteriana se debe a la inhibición

del transporte de electrones de la cual es responsable el grupo 3-formamidosalicílico [250], [261].

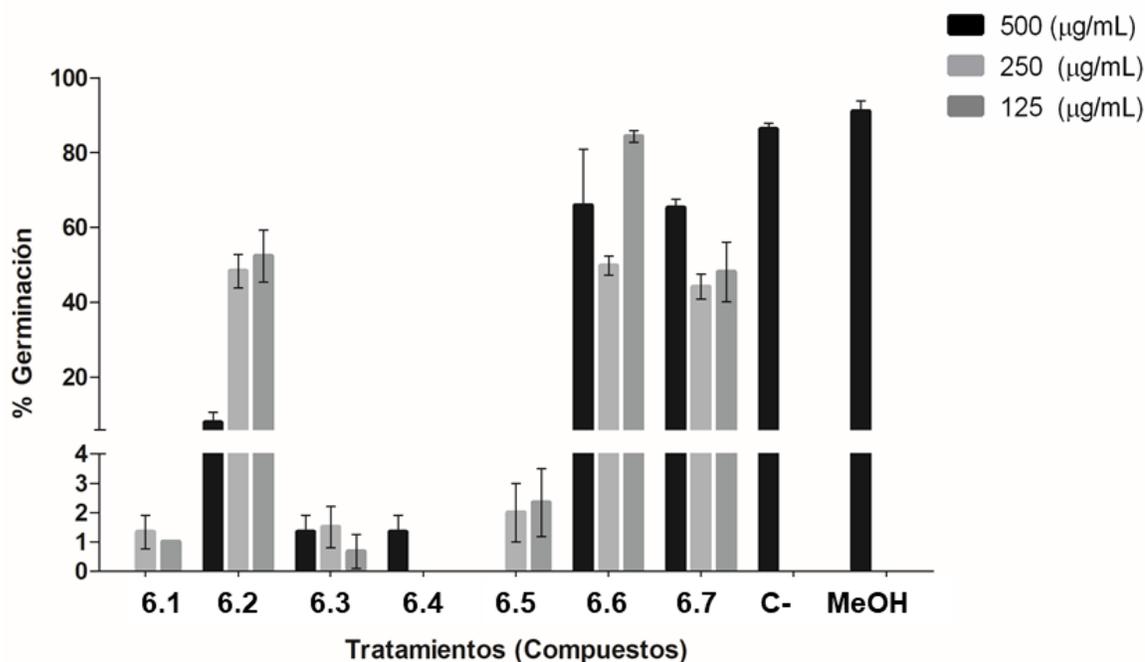


Figura 6.5. Evaluación de la actividad antifúngica de los compuestos 6.1-6.7 expresada en porcentaje de germinación de las conidias del hongo fitopatógeno *C. gloeosporioides*.

De esta manera se determinó que las antimicinas son los compuestos responsables de la actividad observada en el extracto de *Streptomyces* sp. PNM208. Es importante mencionar que si bien se encontraron otras fracciones que contenían otras antimicinas y otras dicetopiperazinas; estos compuestos no lograron aislarse debido a la baja cantidad recuperada de estas fracciones, la complejidad de las mezclas y la similitud de sus estructuras, lo cual dificulta su separación por métodos cromatográficos. Sin embargo, otras aproximaciones como las redes moleculares (*Molecular networking*) basado en los perfiles químicos por MS/MS de los extractos o fracciones, pueden permitir avanzar en caracterizar la producción de los compuestos minoritarios presentes en *Streptomyces* sp. PNM-208 [270].

6.3 Conclusiones

A partir del fraccionamiento bio guiado del extracto orgánico de *Streptomyces* sp PNM-208 se logró el aislamiento y la elucidación estructural de seis compuestos pertenecientes a la familia de las antimicinas la urauchimicina A (**6.1**), urauchimicina C (**6.2**), deisovaleril blastmicina (**6.3**), antimicina A_{6a} (**6.4**), antimicina A_{5a} (**6.5a**), antimicina A_{5b} (**6.5b**) y dos dicetopiperazinas la brevinamida F (**6.6**) y la *ciclo*-[L-Phe-L-Pro] (**6.7**). La estructura de compuestos fue elucidada por RMN 1D y 2D, MS y por comparación con los datos reportados en literatura.

Los compuestos **6.1** a **6.7** fueron evaluados contra el hongo fitopatógeno *C. gloeosporioides* encontrando que los compuestos **6.1**, **6.3**, **6.4** y **6.5** presentaron actividad antifúngica con un porcentaje de germinación de entre 0 y 3% en la mayoría de los casos. Sólo el compuesto **6.2** presentó algunas conidias en estado de germinación con un porcentaje de inhibición cercano al 50% permitiendo así determinar el tipo de compuestos responsables de la actividad observada en el extracto orgánico del aislamiento *Streptomyces* sp. PNM-208.

6.4 Materiales y métodos

6.4.1 General

Los espectros de RMN ¹H, ¹³C y 2D fueron adquiridos en un espectrómetro Bruker Ascend™ 600 (600 MHz para ¹H y 150 MHz para ¹³C) usando CDCl₃, CD₃OD, y DMSO-d₆ como solventes y las señales residuales de solventes fueron usadas como estándar interno. Los datos de masas de alta resolución fueron adquiridos en un espectrómetro de masas Accurate-Mass cuadrupolo tiempo de vuelo (q-TOF) (Agilent Technologies), usando como fuente de ionización ESI en modo positivo. Nebulizador 50 (psi); flujo de gas 10 L/min; temperatura de gas 350°C; fragmentador 175 V; *skimmer* 75 V; V_{pp} 750 V.

La cromatografía en columna (CC) fue llevada a cabo en vacío usando silica gel 60 (70-230 Macherey-Nagel). Los análisis de HPLC-DAD se realizaron en un sistema Agilent Technologies 1260 Infinity y los análisis de HPLC-ELSD se realizaron en un sistema Thermo Dionex ultimate 3000, acoplado a un detector ELSD Sedex 85 (Sedere, France) con una ganancia de 10 y una temperatura de 80°C para el detector ELSD. Para la lectura de los ensayos de actividad antibacteriana en placas de 96 pozos fue usado un lector de placas de ELISA AccuReader

Metertech (Taipei, Taiwan) leyendo a una longitud de onda de 600 nm. Todos los solventes usados fueron grado HPLC.

6.4.2 Fermentación de la cepa y extracción

Streptomyces sp. PNM-208 fue originalmente aislada de una muestra del octocoral *Eunicea fusca*. La secuencia del gen 16S rRNA para esta cepa fue depositada en GenBank/EMBL/DDBJ, bajo el número de acceso KX641401 [158].

El aislamiento se recuperó de su stock a -80 °C y fue cultivado en cajas de Petri con el medio ISP-2 a una temperatura de 28 °C por una semana. Para la obtención del extracto orgánico se realizó un cultivo líquido en dos pasos así: el inóculo inicial de *Streptomyces* sp. PNM-208 fue un cultivo primario de 100 mL en medio Luria-Bertani (LB) en un erlenmeyer de 500 mL con agitación a 130 rpm a 25°C durante cinco días (el medio LB contiene por litro 5 g de extracto de levadura, 10 g NaCl, 10 g triptosa, ajustando el pH a 7.2 usando NaOH 3N). Estos 100 mL de pre-cultivo fueron transferidos a un matraz de 5 L conteniendo 900 mL de medio LB (utilizando 40 matraces para un total de 40 L de cultivo), agitados a 130 rpm a 25°C durante diez días. La biomasa de cada matraz fue removida por centrifugación a 5000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante fue extraído tres veces con acetato de etilo (1:1). Las fases orgánicas de los 40 matraces de cultivo fueron reunidas y luego evaporadas a presión reducida obteniendo 2.8 g de extracto crudo.

6.4.3 Aislamiento de los compuestos

En la Figura 6.1 se presentó el esquema de fraccionamiento realizado sobre el extracto de *Streptomyces* sp. PNM-208. El extracto orgánico crudo fue fraccionado usando un cartucho de extracción en fase sólida (SPE) (Phenomenex Strata C-18, 5 g, 20 mL) con un gradiente discontinuo de MeOH/H₂O, 10%, 30%, 50%, 70% y 100% MeOH (cada una de 30 mL) para obtener 5 fracciones F1 - F5. La fracción F5 (590 mg) eluída con la fase de composición del 100% de MeOH presentó actividad antifúngica y fue separada usando cromatografía en sílica gel 60 usando un gradiente discontinuo desde 100% CHCl₃ a 100% MeOH, para obtener 180 fracciones de 10 mL agrupadas en 26 fracciones (F5.1-F5.26) de acuerdo a sus perfiles en cromatografía en capa delgada (TLC).

A las fracciones de F5.1 - F5.12 se les realizó un perfil por UHPLC usando una columna Kinetex C8 (100 x 4.6 mm, 2.6 μ m) y un flujo de 0.5 mL/min. Ganancia: 10. La fase móvil consistió en MeCN (A) y H₂O (B). El programa de elución comenzó con un 10% de A durante 3 minutos, seguido de un incremento lineal hasta 100% de A en 20 min, luego 2 min en 100% de A. De acuerdo a los perfiles observados (comparado con el extracto orgánico del medio de cultivo LB) y a la cantidad de muestra, se reagruparon las siguientes fracciones para continuar con el aislamiento y la identificación de los compuestos.

Inicialmente se reagruparon las fracciones **F5.3** (66 mg) y **F5.4** (74 mg). La fracción combinada (140 mg, eluída con CHCl₃/MeOH 98:2) fue nuevamente fraccionada por HPLC preparativo. Los análisis cromatográficos fueron realizados usando una columna Kromasil C18 (10 x 250 mm, 10 μ m) y un flujo de 2.0 mL/min. La fase móvil consistió en MeCN (A) y H₂O (B). El programa de elución comenzó con un 80% de A seguido de un incremento lineal hasta 100% de A en 30min, luego 20 min a 100% de A. De esta fracción se obtuvieron los compuestos **6.4** (1,7 mg) y **6.5** (1,2 mg)

La fracción **F5.5** (187,8 mg, eluída con CHCl₃:MeOH 98:2) fue fraccionada por HPLC preparativo. Los análisis cromatográficos fueron realizados usando una columna Kromasil C8 (10 x 250 mm, 10 μ m) y un flujo de 2.0 mL/min. La fase móvil consistió en MeCN (A) y H₂O (B). El programa de elución comenzó con un 30% de A seguido de un incremento lineal hasta 55% de A en 20 min, luego 10 min a 55% de A. Luego otro incremento lineal hasta 80% de A en 25 min seguido por 5 min a 80% de A. De esta fracción se obtuvieron los siguientes compuestos: **6.7** (55,9 mg), **6.3** (10,2 mg) y **6.1** (2,4 mg)

Posteriormente se reagruparon las fracciones **F5.6** (25 mg eluída con CHCl₃:MeOH 96:4), **F5.7** (29 mg eluída con CHCl₃:MeOH 96:4), y **F5.8** (17mg eluída con CHCl₃:MeOH 94:6). La combinación de estas fracciones fue fraccionada por HPLC preparativo, empleando una columna Kromasil C18 (10 x 250 mm, 10 μ m) y un flujo de 2.0 mL/min. La fase móvil consistió en MeCN (A) y H₂O (B). El programa de elución comenzó con un 30% de A durante 10 min, seguido de un incremento lineal hasta 55% de A en 10 min, luego 10 min a 55% de A. Posteriormente otro incremento lineal hasta 80% de A en 5 min, seguido de otro incremento hasta 100% de A en dos minutos, seguido por 6 min de 100% de A. De esta separación se obtuvieron los compuestos **6.2** (1,8 mg) **6.6** (3,2 mg)

6.4.4 Ensayos de actividad antimicrobiana

Para los ensayos de actividad antifúngica de las fracciones y extractos, se empleó el mismo hongo descrito en la sección 3.4.1.2 de este texto. Se realizó el bioensayo de difusión en placa de actividad antifúngica de cada una de las fracciones contra *Colletotrichum gloeosporioides*. Para realizar el ensayo, primero se realizó una suspensión de conidias. En un falcon se colocaron 10 mL de solución salina al 0.85 % y con un hisopo se realizó un raspado del hongo esporulado en medio sólido PDA. El tapete de conidias se sembró con hisopo en cajas de petri que contenían 25 mL de agar PDA.

Cada fracción se disolvió en metanol al 10% (2 mg/mL). Se realizaron tres diluciones seriadas y se hicieron pozos en los cuales se dispensaron 80 µL de cada solución (500 µg/por pozo, 250 µg/por pozo y 125 µg/por pozo). Como control positivo se empleó clotrimazol al 1% y como control negativo metanol al 10%. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente y finalmente el ensayo fue leído a las 98 horas.

Para evaluar la actividad antifúngica de los compuestos puros inicialmente el hongo *C. gloeosporioides* fue crecido en medio sólido PDA durante 7 días. Transcurridos los 7 días fue preparada una suspensión de conidias la cual fue diluida en solución salina estéril hasta alcanzar una concentración de 10^3 conidias/mL. Soluciones de los compuestos **6.1** - **6.7**, a concentraciones de 500 µg/mL, 250 µg/mL y 125 µg/mL fueron puestas en contacto con la suspensión de conidias respectivamente, 15 µL de estas suspensiones fueron aplicadas sobre cajas de agar agua, estas se incubaron por 8 horas a 25°C. Pasado el tiempo de incubación, cien conidias fueron dispuestas en láminas porta objetos para determinar el porcentaje de germinación.

7. Feniletilamidas producidas por *Streptomyces* sp. PNM-9 y la evaluación de su producción en diferentes medios de cultivo por técnicas metabolómicas

7.1 Introducción

La producción de compuestos en actinobacterias se ve afectada por factores como el pH, la disponibilidad de nutrientes, la concentración de oxígeno y la temperatura. Adicionalmente, esta producción en *Streptomyces* spp. se encuentra asociada con el desarrollo de las fases de crecimiento MI, MII y el periodo de pre esporulación en cultivos sólidos [210], [271]–[274].

De otro lado, para monitorear la producción metabólica de los microorganismos, la espectroscopía de RMN es una técnica analítica que ofrece varias ventajas como la posibilidad de una cuantificación absoluta y relativa, una completa identificación de los metabolitos producidos, automatización de la preparación de la muestra y alta reproducibilidad en los datos adquiridos [275], [276]. Varias aplicaciones han sido reportadas para esta técnica, como variaciones metabólicas en plantas [277], [278] o la cuantificación de metabolitos en fluidos humanos [238] entre otras.

Así, en este capítulo se buscó contribuir al estudio de la producción metabólica de los aislamientos de actinobacterias obtenidos en este trabajo, y a la evaluación del efecto del medio de cultivo y el tiempo de cultivo en el perfil metabólico.

Para esto, se seleccionó el aislamiento *Streptomyces* sp. PNM-9, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la evaluación de actividad contra las bacterias fitopatógenas *B. glumae* y *B. gladioli*. *Streptomyces* sp. PNM-9, fué aislada de una muestra de algas pertenecientes al género *Dictyota* sp, el análisis filogenético indicó que el vecino cercano de esta cepa es

Streptomyces pratensis con un 100% de similitud, adicionalmente *Streptomyces* sp. PNM-9 resultado de interés al ser el único representante del OTU3 (capítulo 2).

Para el estudio de la variación en su producción metabólica, este aislamiento fue cultivado en cuatro medios de cultivo TSB, TSBm, LB y LBm durante un periodo de 15 días de incubación. Los perfiles obtenidos por RMN para los extractos orgánicos de *Streptomyces* sp. PNM-9 fueron correlacionados con la actividad antimicrobiana contra las bacterias fitopatógenas *B. glumae* y *B. gladioli*, haciendo uso de herramientas estadísticas como el análisis multivariado (MVDA).

7.2 Resultados y discusión

7.2.1 Evaluación de la producción de biomasa y la actividad de los extractos orgánicos

Como una contribución a evaluar el efecto del medio de cultivo en la producción de compuestos bioactivos en el aislamiento *Streptomyces* sp. PNM-9, este fue cultivado en cuatro medios de cultivo (TSB, TSBm, LB, LBm), durante 15 días de cultivo tomando muestras a los días 1, 2, 3, 4, 5, 10 y 15. Los extractos obtenidos fueron evaluados contra *B. glumae*, dado que esta es la responsable de la mayor cantidad de pérdidas en los cultivos de arroz además de presentar la aparición de resistencia frente a las estrategias de control químico tradicional [279], [280]

Los datos de producción de extracto orgánico mostraron que la fermentación en los medios TSB y LB producen la mayor cantidad de extracto en tanto que los medios mínimos presentaron bajos rendimientos en términos de cantidad de extracto orgánico obtenido (Figura 7.1).

En lo referente a la actividad antibacteriana, se observó que la actividad más alta se obtuvo en el extracto orgánico del medio TSB con 2 días de incubación y en los extractos orgánicos de los medios TSB y LB a los 15 días de incubación, tal como se presenta en la Figura 7.1. Interesantemente, una reducción en más del 50% de la supervivencia bacteriana del patógeno fue alcanzada tanto en el medio TSB como TSBm desde el día dos. Sin embargo, los extractos en TSB a los días 3, 4, 5 y en TSBm al día 3 presentaron un incremento inesperado en la

supervivencia del patógeno, seguido de una segunda disminución de la supervivencia del patógeno desde el día 5 en adelante. Lo anterior sugiere una primera producción rápida de compuestos antimicrobianos (día 1 y 2), seguido de un segundo pico de producción desde el día dos hasta el día 15.

Un patrón similar es observado en el medio LB, donde la reducción de la supervivencia bacteriana por debajo del 50% fue alcanzada en el día 4, seguido de un incremento en la supervivencia bacteriana en las muestras tratadas con el extracto de LB con 5 días de incubación y una nueva reducción del crecimiento bacteriano en el día 5 y 15 (Figura 7.1).

Es de resaltar que se observa una correlación entre la actividad antibacteriana de los extractos orgánicos y su producción en términos de peso seco, por ejemplo, el extracto orgánico del medio TSB inoculado con *Streptomyces* sp. PNM-9 presenta el valor de supervivencia bacteriana más bajo y la mayor cantidad de extracto producido en 100 mL. Esto es observado para el medio LB, caso contrario a lo observado para los medios LBm y TSBm los cuales presentan baja actividad antibacteriana y baja producción de extracto orgánico (Figura 7.1B).

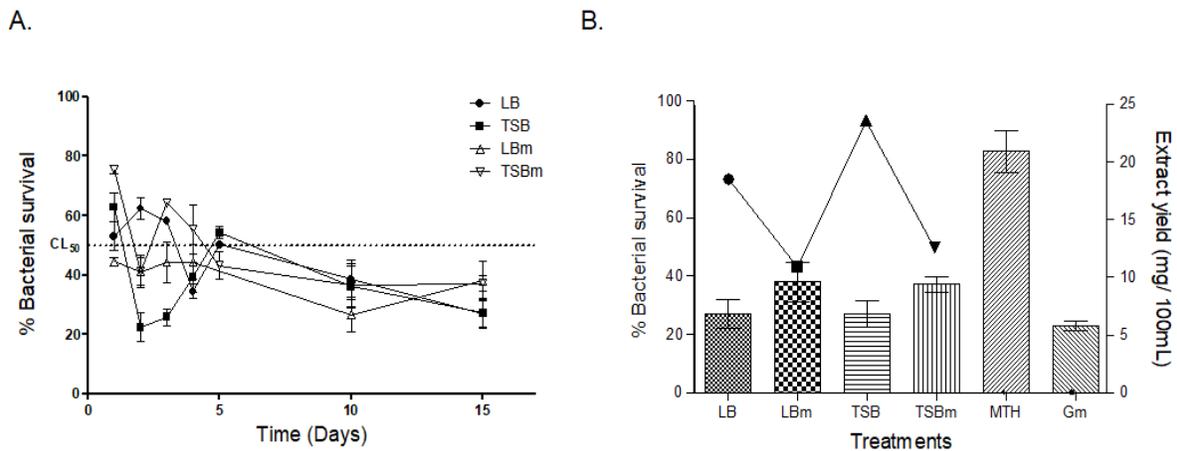


Figura 7.1 Actividad antibacteriana de los extractos orgánicos de *Streptomyces* sp. PNM-9. **A.** Cinética de actividad antibacteriana de los extractos de PNM-9 (250 µg/mL) en cuatro medios líquidos. **B** Correlación de la producción de biomasa (lineas) con la actividad antibacteriana en cada uno de los cuatro medios (barras), teniendo como control negativo una solución de metanol en agua 10% (MTH) y como control positivo gentamicina 20.µg/mL. La figura presenta el promedio ± la desviación estándar de las tres replicas independientes.

Varios autores han descrito que durante las primeras 48 horas el desarrollo fenotípico de los microorganismos en cultivos sumergidos se encuentra en el crecimiento micelial vegetativo diferenciado a la fase de micelio multinucleado MII (o fase de pre-esporulación) [281]. Durante esta fase, la producción de metabolitos secundarios incluyendo antibióticos, incrementa. Esto fue descrito para *S. coelicolor* A2, donde el micelio en fase II presentó sobreexpresión de los genes que codifican para antibióticos como la actinorodina, undeciloprodigiosina o la geosmina [272]. En este mismo sentido, estudios realizados sobre cultivos sumergidos de *S. coelicolor* a las 350 horas (14 días) presentaron un pico en la producción de actinorodina [273]. Este fenotipo estaba asociado con un segundo estado de crecimiento que lleva a la diferenciación de tejido micelial. Estos datos correlacionan con los perfiles de actividad obtenidos en este trabajo, donde dos picos de actividad fueron observados con los extractos obtenidos a los días 2 y 15 de crecimiento en los cultivos sumergidos.

7.2.2 Perfilado metabólico de *Streptomyces* sp. PNM-9 y correlación con su perfil de bioactividad

El perfilado metabólico por medio de la espectroscopía de RMN fue empleado para observar la producción metabólica durante los 15 días de cultivo y correlacionarla con la actividad antimicrobiana descrita anteriormente. Para esto, los mismos extractos previamente obtenidos fueron analizados por el experimento NOESY-¹H 1D, secuencia de alta reproducibilidad con una supresión eficiente de la señal del agua [282]. Esto es necesario debido a que la mayoría de estas muestras son basadas en agua, e incluso los extractos secos son usualmente resuspendidos en soluciones acuosas y como las concentraciones de los metabolitos en la mayoría de las muestras son usualmente bajas (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ to 50 mmol L^{-1}), comparado con la concentración de los protones en el agua (aproximadamente 110 mol L^{-1}), es necesario realizar la supresión antes mencionada [283]. El experimento NOESY-¹H 1D fue seleccionado para este análisis debido a que el pulso de excitación es reemplazado por tres pulsos consecutivos donde el tiempo mezclado es bajo (típicamente 10 ms) y es introducido entre el segundo y el tercer pulso. Los tres pulsos efectivamente reemplazan el pulso sencillo de excitación en el experimento de pre-saturación y resulta en una excitación más uniforme de la muestra, que conlleva a una supresión del agua mejor que los experimentos comunes de pre-saturación [284], [285]. Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis estadístico con el

separación de los grupos. Los grupos activos (círculos negros) que se localizaron en el lado positivo a lo largo del eje OPLS1 y los grupos inactivos (círculos blancos) que se localizaron en el lado negativo a lo largo del eje OPLS2 (Figura 7.3A). De igual forma, las dos muestras más activas pueden ser identificadas en el lado positivo del eje OPLS1 (forma triangular).

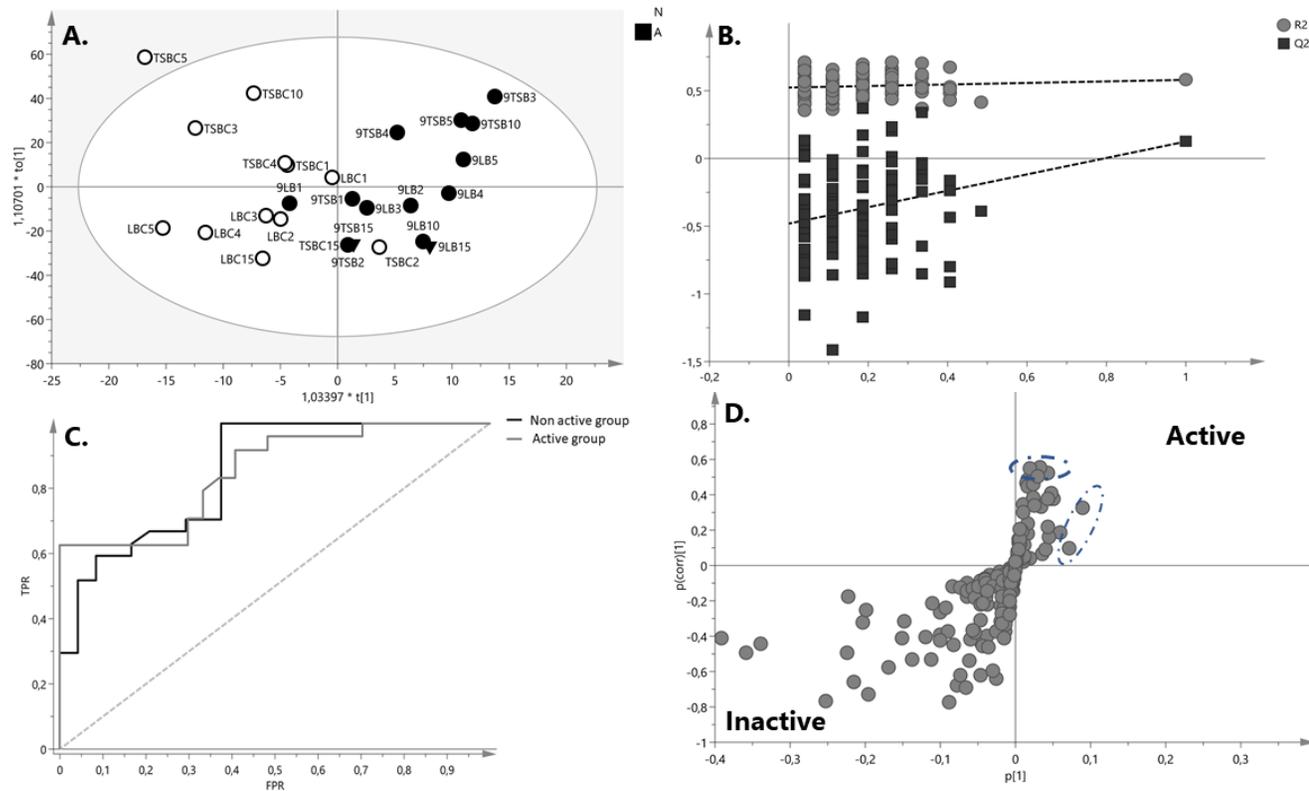


Figura 7.3 Análisis multivariado de la actividad antibacteriana contra *B. glumae*.

(A) *score plot* de los 28 extractos de TSB y LB inoculados con *Streptomyces* sp. PNM-9 con sus respectivos blancos de medio de cultivo. Extractos activos (color negro) Vs. Extractos no activos (color blanco). **(B)** Resultado del test de permutación del modelo OPLS-DA. **(C)** Curva ROC que afirma la validez de predicción del modelo, respecto a un grupo activo Vs. grupo inactivo. El área bajo la curva fue 0.85 (un modelo ideal tendría un AUC de 1) claramente establece que la predicción del modelo fue robusta. **(D)** S-plot generado del modelo OPLS-DA, muestra las variables que podrían ser responsables de la bioactividad (marcadas en azul), estas corresponden a desplazamientos químicos en δ_H 7.47, 7.42, 2.77, y 0.80.

La calidad y robustez del modelo OPLS-DA fue validada por un test de permutación ($n=100$). El intercepto del valor de Q^2 fue -0.481 (menor a 0.05), encontrándose que el modelo original es estadísticamente efectivo (Figura 7.3B). Además, el modelo fue validado por el cálculo del área bajo la curva característica operativa del receptor (ROC). El valor del área bajo la curva (AUC) fue 0.85 que añade confianza al modelo (Figura 7.4C).

El S-plot (Figura 7.3D), muestra las variables importantes de la proyección (VIPs) con sus respectivos desplazamientos químicos que podrían ser las responsables de la actividad antibacteriana. En este análisis se evidencia la presencia de señales en δ_H 0.80 ppm (protones alifáticos), 2.77 ppm (protones bencílicos), 5.62 ppm (protones NH de amidas), 7.42 ppm (protones aromáticos), 7.47 ppm (protones aromáticos) y 8.07 ppm. Con el objetivo de aislar e identificar estos compuestos, se realizó el estudio químico del extracto orgánico de *Streptomyces* sp. PNM-9 el cual se presenta a continuación.

Con el fin de identificar en qué días se pueden encontrar estas variables, se realizó una comparación de los perfiles de RMN 1H de los días 1, 2, 5, 10, 15 y su respectivo control de medio de cultivo (Figura 7.4). En esta figura se puede observar la presencia de dos de las VIPs encontradas en el S-Plot (δ_H 7.42 (d, $J=7.7$ Hz), 5.60 (bs) y 5.62 (bs)), en los días 2, 5 y 15. Los cuales como se mencionó anteriormente son aquellos en donde se presentan picos de actividad antibacteriana, que puede estar asociado a la producción selectiva de metabolitos con estos desplazamientos químicos característicos.

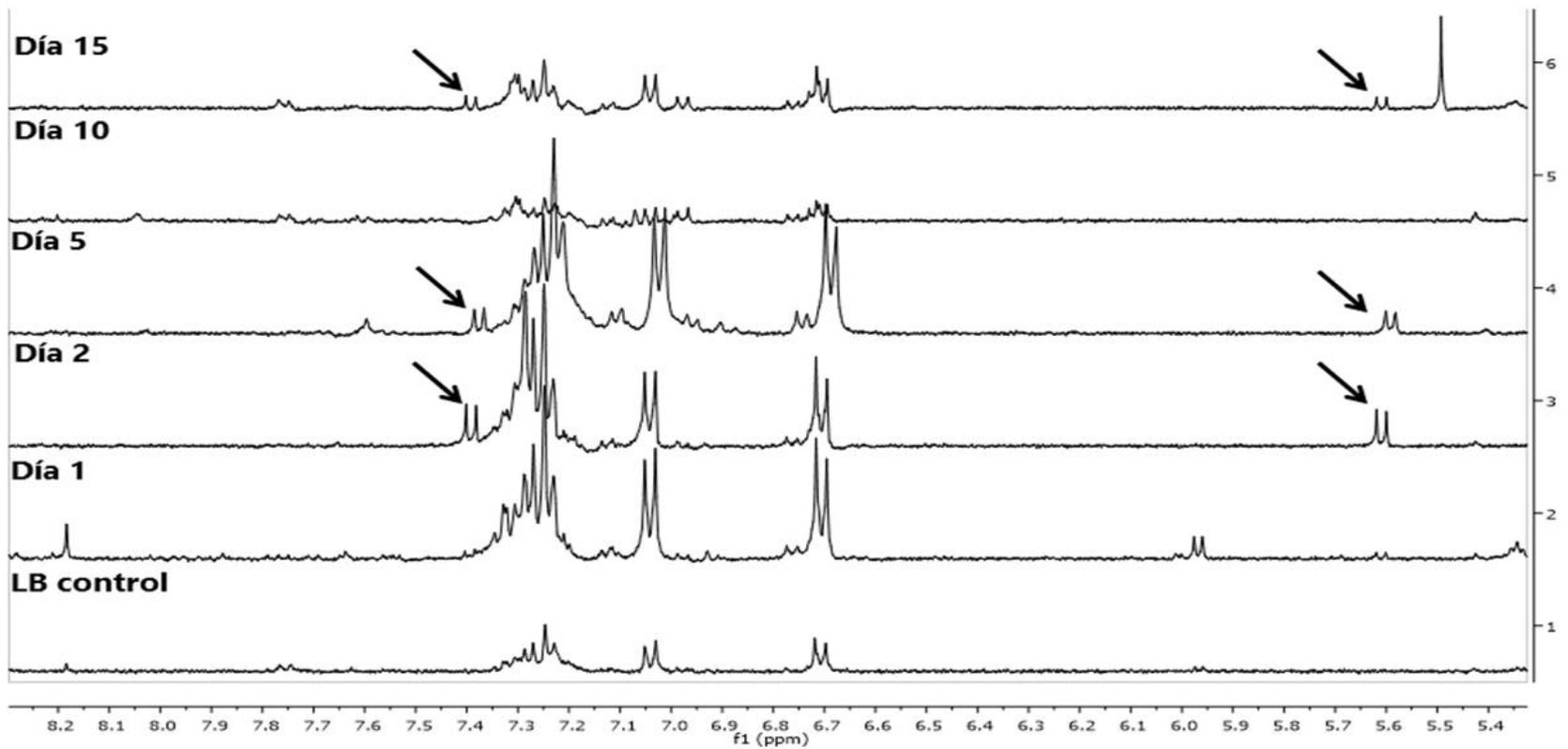


Figura 7.4 Comparación de los perfiles en los días 1, 2, 5, 10 y 15. Con las flechas se muestran las señales que corresponden a las VIPs encontradas en el análisis multivariado y su producción selectiva en los días 2, 5 y 15.

7.2.3 Aislamiento e identificación de los compuestos antimicrobianos producidos por *Streptomyces* sp. PNM-9

Streptomyces sp. PNM-9 fue cultivado por 15 días en 10 L de medio TSB como se menciona en la metodología. A partir de su extracto de acetato de etilo se realizó un fraccionamiento bioguiado hasta aislar e identificar los compuestos **7.1** y **7.2** (Figura 7.5). La fracción activa F4.6.5 (6 mg) fue fraccionada por HPLC preparativo con un gradiente ACN/H₂O, para así obtener los compuestos **7.1** ($t_R = 23.0$ min, 0.6 mg) y **7.2** ($t_R = 24.0$ min, 1.0 mg) (Anexo 50)

El compuesto **7.1** fue aislado como un sólido amorfo $[\alpha]^{20}_D = +43.15$ ($c = 0.059$; CHCl₃), en HR ESI-MS presentó un pico con un m/z de 206.1560 para el ión molecular protonado $[M+H]^+$, consistente con la fórmula molecular C₁₃H₁₉NO (calculado para C₁₃H₁₉NO $m/z = 206.1540 \Delta 9.7$ ppm). En el espectro de RMN-¹H (500 MHz, cloroformo-*d*₁, Anexo 51), se encontraron las siguientes señales δ_H 7.31 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.24 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.20 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 5.41 (brs, 1H), 3.54 (q, $J = 13.6$ Hz, 2H), 2.82 (m, 2H), 2.01 (m, 1H), 1.63 (m, 1H), 1.39 (m, 1H), 1.07 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H) y 0.86 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). Por derreplicación con las bases de datos Antimarin® y Antibase, el compuesto **7.1** fue identificado como 2-metil-N-(2'-feniletíl)-butanamida (Figura 7.6).

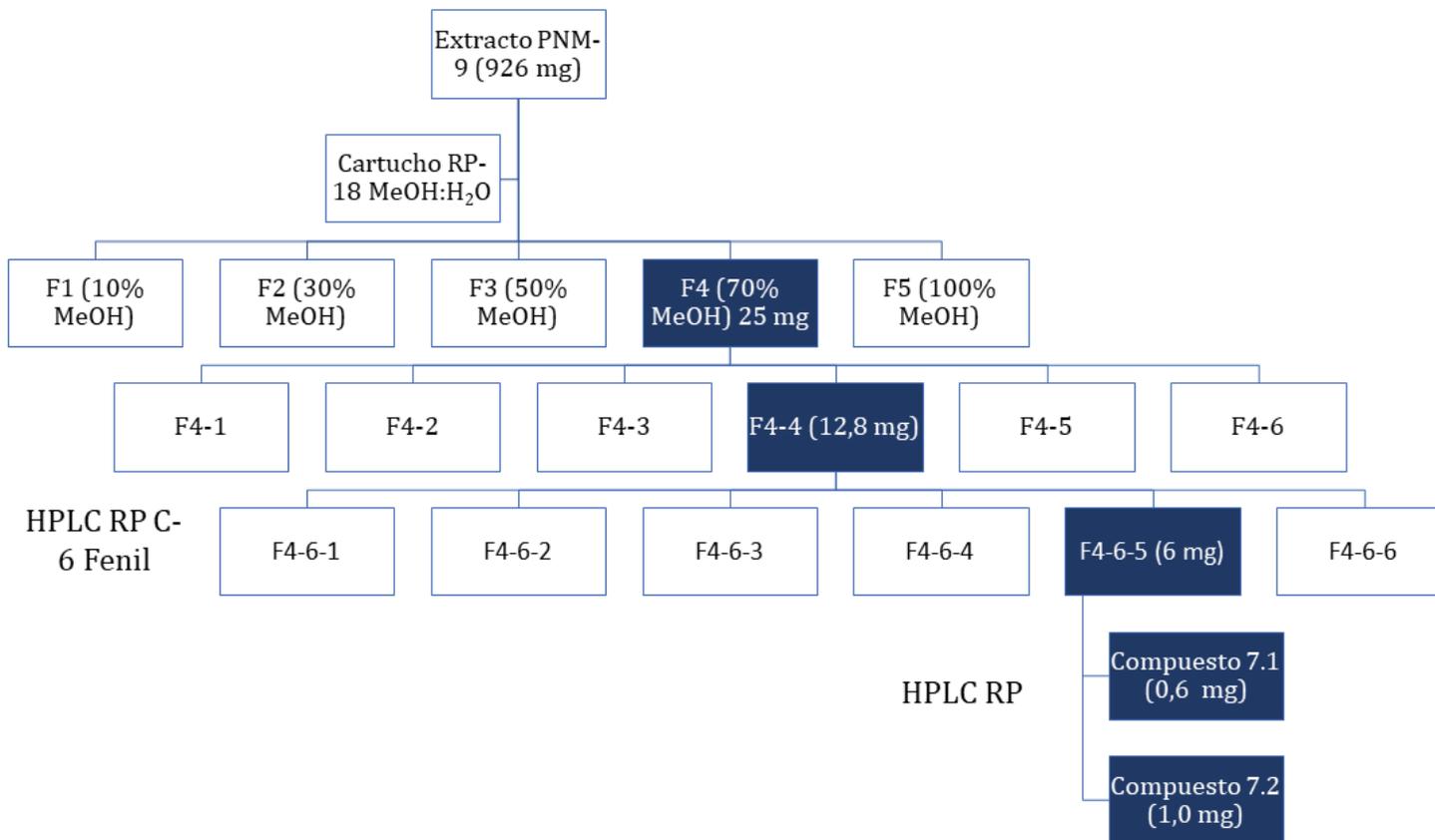


Figura 7.5 Esquema de fraccionamiento del extracto orgánico obtenido de *Streptomyces sp.* PNM-9.

El compuesto **7.2** fue aislado como un sólido amorfo, HR ESI-MS presentó un pico con un m/z de 206.1562 para el ión molecular protonado $[M+H]^+$, consistente con la fórmula molecular $C_{13}H_{19}NO$ (calcd para $C_{13}H_{19}NO$ m/z= 206.1540 Δ 10.6 ppm). En el espectro de RMN- 1H (500 MHz, cloroformo- d_1 , Anexo 52), se encontraron las siguientes señales δ_H 7.31 (t, $J= 7.4$ Hz, 2H), 7.24 (d, $J= 7.3$ Hz, 1H), 7.20 (d, $J= 7.5$ Hz, 1H), 5.38 (brs, 1H), , 3.54 (dd, $J= 13.1$ Hz; 6.6 Hz, 2H), 2.82 (t, $J= 6.9$ Hz, 2H), 2.06 (m, 1H), 1.98 (d, $J= 6.9$ Hz, 2H) y 0.92 (d, $J= 6.6$ Hz, 3H). Por derreplicación con las bases de datos Antimarin® y Antibase, el compuesto **7.2** fue identificado como 3-metil-N-(2'-feniletil)-butanamida (Figura 7.6).

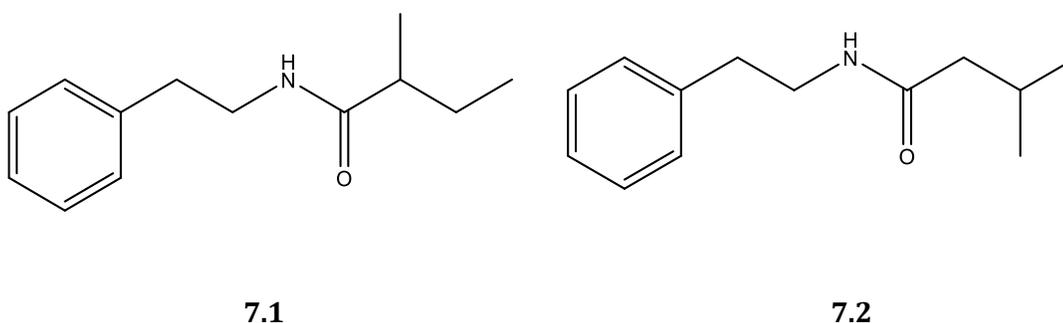


Figura 7.6 Estructuras de los compuestos 7.1 y 7.2 responsables de la actividad antibacteriana contra *B. glumae* y *B. gladioli*

Las señales de RMN para estos dos compuestos fueron revisados nuevamente en el S-plot (generado por el modelo OPLS-DA que se presentó anteriormente) y las señales en RMN que corresponden a sus estructuras se localizaron en el lado activo de la gráfica, sugiriendo que la actividad antibacteriana puede ser debida a estos dos compuestos (Figura 7.7).

Los compuestos **7.1** y **7.2** han sido previamente aislados de cultivos de la bacteria simbiote *Xenorhabdus nematophilus* recuperada del nematodo entomopatógeno *Steinernema glaseri* de una muestra de suelo recolectada en varias locaciones del sur de Corea. También se reportó su actividad citotóxica contra líneas celulares de adenocarcinoma gástrico (SNU668), adenocarcinoma de colón (HT-29) y adenocarcinoma de pulmón (NCIH1703) [286].

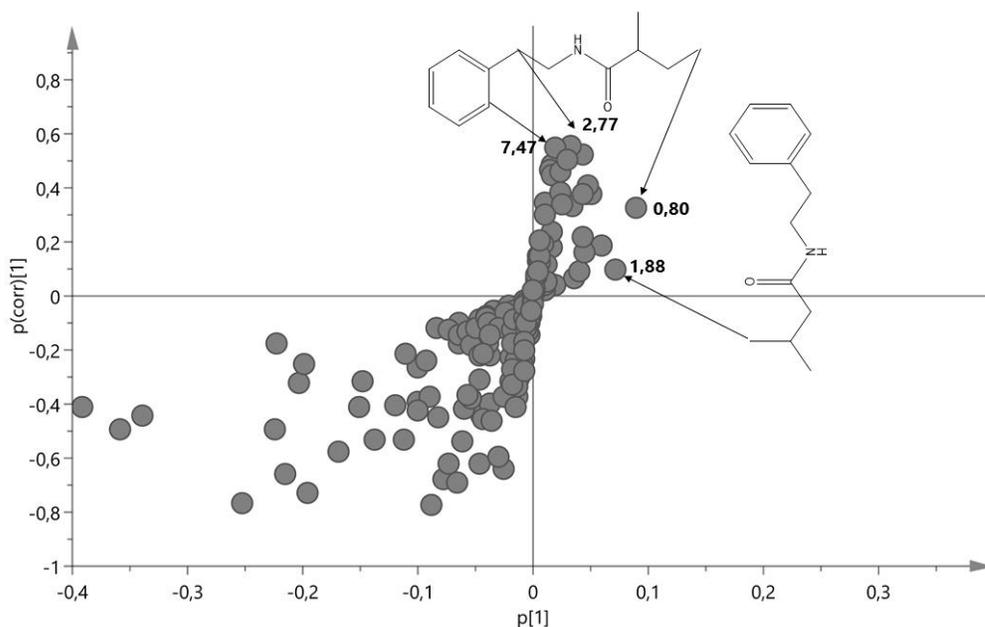


Figura 7.7 Los dos compuestos aislados de *Streptomyces* sp. PNM-9 marcados en el S-plot, ambos se encuentran en el sitio activo del gráfico.

Adicionalmente, estos metabolitos han sido evaluados en ensayos antifouling [287] y como inhibidores del *quorum sensing* contra los biosensores *Chromobacterium violaceum* CV026, *Vibrio fischeri* y una cepa mutante de *Escherichia coli* JB525 [288]–[290]. Los tamaños moleculares similares y sus estructuras de los inhibidores de autoinductores de AHL sugieren que las feniletilamidas podrían mimetizar estructuralmente a las AHL y competir por el sitio de unión. Como las AHLs, las feniletilamidas poseen un anillo con una cadena lateral conectada a través de un enlace amida.

Finalmente, el resultado de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos **7.1** y **7.2** presentó que ambos compuestos fueron activos contra el fitopatógeno del arroz *B. glumae* (ATCC 33617) con un valor de MIC de **2.4 mM** y **1.2 mM**, respectivamente; así estos compuestos son los responsables de la actividad antibacteriana presentada en el extracto crudo.

7.3 Conclusiones

En el estudio químico de la cepa *Streptomyces* sp. PNM-9 se emplearon herramientas de análisis multivariado con el fin de correlacionar el perfil metabólico por RMN con su actividad biológica contra los fitopatógenos del arroz *B. glumae* y *B. gladioli*, encontrando una correlación directa entre la producción metabólica diferencial y su actividad antibacteriana ya que en los días 2, 5 y 15 de incubación se presentan picos de actividad y así mismos picos de producción metabolitos activos.

Adicionalmente, a partir de la fermentación líquida de *Streptomyces* sp. PNM-9 en medio TSB se logró el aislamiento bioguiado y la elucidación de los compuestos 2-metil-N-(2'-feniletil)-butanamida (**7.1**) y la 3-metil-N-(2'-feniletil)-butanamida (**7.2**) a partir del extracto orgánico. Las estructuras fueron confirmadas con los datos de RMN 1D, 2D y MS. Estos compuestos presentaron una MIC de 2.43 mM y 1.21 mM respectivamente contra el fitopatógeno *B. glumae*.

El uso de métodos que permiten correlacionar la actividad biológica de una cepa de interés con su composición metabólica permitió conocer de manera previa las características estructurales de los posibles compuestos responsables de la actividad antibacteriana presentada por la cepa *Streptomyces* sp. PNM-9 la cual posteriormente fue confirmada mediante la realización de bioensayos, ahorrando esfuerzos en la búsqueda de compuestos que no presentan la actividad de interés.

7.4 Materiales y métodos

7.4.1 General

Los espectros de RMN ^1H , ^{13}C y 2D fueron adquiridos en un espectrómetro Bruker-DRX500 (500.13 MHz para ^1H y 125.77 MHz para ^{13}C), los experimentos NOESY- ^1H 1D fueron adquiridos en un espectrómetro Bruker Advance 400 (400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C), usando CDCl_3 y CD_3OD , como solventes y las señales residuales de solventes fueron usadas como estándar interno. Los datos de masas de alta resolución fueron adquiridos en un espectro de masas Accurate-Mass cuadrupolo tiempo de vuelo (q-TOF) (Agilent Technologies), modo positivo ESI. Nebulizador 50 (psi); flujo de gas 10 L/min; temperatura de gas 350°C; fragmentador 175 V; *skimmer* 75 V; *Vpp* 750 V.

Los análisis de HPLC-DAD-ELSD se realizaron en un sistema SHIMADZU-LT Serial L203152 00352 Acoplado a un detector ELSD -DAD y en un sistema Thermo Dionex ultimate 3000, acoplado a un detector ELSD Sedex 85 (Sedere, France) con una ganancia de 10 y una temperatura de 80°C para el detector ELSD y una longitud de onda de 200 y 210 nm para el detector DAD. La determinación de la rotación óptica fue hecha en un polarímetro Polartronic E, Schmidt + Haensch equipado con una celda de 1 mL 5 cm. Para la lectura de los ensayos de actividad antibacteriana en placas de 96 pozos un lector de placas de ELISA AccuReader Metertech (Taipei, Taiwan) fue usado leyendo a una longitud de onda de 600 nm. Todos los solventes usados fueron grado HPLC.

7.4.2 Medios de cultivo y condiciones

Para llevar a cabo esta investigación la ANLA (Autoridad Nacional de Licencias Ambientales) y el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible otorgaron el permiso para coleccionar muestras y estudiar las bacterias recuperadas (Permiso No. 4 del 10/02/2010, Anexo 2, Contrato de Acceso a Recurso Genético No 108). *Streptomyces* sp. PNM-9 fue originalmente aislada de una muestra de *Dictyota* sp. (Chlorophyta) [158]. La secuencia del gen 16S rRNA para esta cepa fue depositada en GenBank/EMBL/DDBJ, bajo el número de acceso KX641380

Los medios tripticasa soya (TSB), tripticasa soya mínimo (TSBm), Luria-Bertani (LB) y Luria-Bertani mínimo (LBm) fueron usados como medios de cultivo para la fermentación líquida. El medio LB totalmente suplementado contiene por litro 5 g de extracto de levadura, 10 g de cloruro de sodio, 10 g de triptona y pH 7.3 ajustado con NaOH 3N; del mismo modo. El medio TSB contiene por litro 17 g de triptona, 3 g Bacto™, 2.5 g de glucosa, 5 g de cloruro de sodio, 2.5 g de fosfato dipotásico de hidrógeno a pH 7.3 ajustado con NaOH 3N. Los medios LBm y TSBm tienen la misma composición que los medios completamente suplementados, pero diluida 10 veces. 5 plugs de *Streptomyces* sp. PNM-9 previamente crecidos en medio sólido ISP2, fueron inoculados en 100 mL de los medios LB, LBm, TSB y TSBm en matraces de 500 mL; cada matraz fue incubado a 25 °C con agitación continua por 15 días a 130 rpm.

7.4.3 Estudio del cultivo en 15 días

Los cultivos de *Streptomyces* sp. PNM-9 en los cuatro medios de cultivo y sus respectivos blancos de medio de cultivo, fueron muestreados (en un ensayo destructivo) a los días 1, 2, 3, 4, 5, 10 y 15. El micelio fue removido por centrifugación a 5000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante y los blancos de medio de cultivo fueron extraídos tres veces con acetato de etilo (1:1). La fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ anhidro y el solvente fue evaporado a presión reducida a 40°C. Los extractos obtenidos fueron criopreservados a -80°C hasta su análisis por RMN y sus respectivos bioensayos.

7.4.4 Adquisición de los datos de RMN y análisis

2 mg de cada extracto fueron disueltos en 500 µL methanol-*d*₄ y empacados en tubos de RMN de 5 mm de diámetro. Una mezcla de los extractos orgánicos del medio TSB fue usada como muestra control de calidad (QC pool). Del mismo modo una alícuota de la una solución (1 mg/mL) de cada extracto orgánico fue mezclada para obtener la muestra QC pool, que fue analizada bajo las mismas condiciones de las demás muestras obtenidas [291].

Cada muestra fue analizada en un espectrómetro Bruker Ultrashield Advance de 400 MHz. Las muestras fueron medidas a una temperatura de 298 K en modo completamente automático. Una vez insertada cada muestra, una espera larga (180 s) antes de la adquisición es realizada, para asegurar que la temperatura de la muestra dentro del magneto esta equilibrada. Los parámetros tuning automático, *matching* (ATMA), *locking* (LOCK) y *shimming* (TOPSHIM) fueron ajustados usando las rutinas estándar de Bruker.

El experimento NOESY-¹H 1D consiste en un experimento 1D con supresión de la señal del agua durante el tiempo de relajación, 4 *dummy scans* y 64 scans fueron medidos (aprox. 8 min) operando a una frecuencia para el núcleo del protón a 400.13 MHz, usando los siguientes parámetros: 0.12 Hz/punto, ancho de pulso (PW)= 12.3 µs y tiempo de relajación (RD)= 2.0 s. Los decaimientos libres (FIDs) fueron transformados haciendo uso de la transformada de Fourier con un ancho de línea (LB) de 0.30 Hz. Una ventana espectral de 10 ppm. A los espectros obtenidos se les ajusto manualmente la fase, se les realizo la corrección de la línea base y fueron calibrados usando la señal residual del methanol-*d*₄ a 3.32 ppm, utilizando el software TopSpin (versión 3.2 pl6, Bruker).

El experimento NOESY-¹H 1D fue procesado siguiendo los parámetros de Kim et al. (2010) [292]. El software MestReNova fue usado para convertir los espectros a un archivo ASCII, con un escalamiento de intensidad total. El *Bucketing* o *binning* fue realizado, los datos espectrales fueron reducidos a regiones con el mismo ancho (0.04 ppm) en la ventana espectral entre 0.5-10 pm. La región en 3.25-3.35 ppm fue removida del análisis debido a la presencia de la señal residual del solvente. El análisis de componentes principales (PCA), análisis jerárquico de clústers (HCA) y proyección ortogonal de estructuras latentes (OPLS) fueron realizados bajo el escalamiento de Pareto y llevados a cabo con el software SIMCA-P+ (versión 14.1, Umetrics, Umea, Sweden).

7.4.5 Aislamiento de los compuestos bioactivos

El aislamiento se recuperó de su stock a -80°C y fue cultivado en cajas de Petri con el medio ISP-2 a una temperatura de 28 °C por una semana. Para la obtención del extracto orgánico se realizó un cultivo líquido en dos pasos así: el inóculo inicial de *Streptomyces* sp. PNM-9 fue un cultivo primario de 100 mL en medio TSB en un erlenmeyer de 500 mL con agitación a 130 rpm a 25°C durante cinco días. Estos 100 mL de pre-cultivo fueron transferidos a un matraz de 5 L conteniendo 900 mL de medio TSB (utilizando 10 matraces para un total de 10 L de cultivo), agitados a 130 rpm a 25°C durante diez días. La biomasa de cada matraz fue removida por centrifugación a 5000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante del cultivo fue extraído tres veces con acetato de etilo (1:1). Las fases orgánicas de los 10 matraces de cultivo fueron reunidas y luego evaporadas a presión reducida a 40°C obteniendo 1000 mg de extracto crudo.

El fraccionamiento bio guiado a los 1000 mg de extracto orgánico obtenidos fue hecho usando un cartucho de extracción en fase sólida (SPE) (HyperSep Thermo Scientific C-18) con un gradiente discontinuo de MeOH:H₂O, obteniendo 5 fracciones F1 (10% MeOH), F2 (30% MeOH), F3 (50% MeOH), F4 (70% MeOH) y F5 (100% MeOH). La fracción activa F4 (25.0 mg) fue fraccionada por HPLC preparativo con una columna Phenomenex Kinetex C8 (100 Å 2.6 µm 100x4.6 mm) y un gradiente con ACN:H₂O para obtener seis fracciones, F4-1 a F4-6. La fracción F4-4 (12.8 mg) fue luego fraccionada usando una columna Gemini C-6 fenil (110 Å 5 µm 250x10 mm) y un gradiente con ACN:H₂O, obteniendo seis fracciones F4-6-1 a F4-6-6. Finalmente, la fracción F4-6-5 (6 mg) fue fraccionada por HPLC preparativo con un gradiente ACN:H₂O, que comenzó con 10% ACN por 3 min, desde 10% al 25% en 10 min, desde 25% al

95% en 5 min y desde 95% a 10% en 3 min con un flujo de 0.5 mL/min, para así obtener los compuestos **7.1** ($t_R = 23.0$ min, 0.6 mg) y **7.2** ($t_R = 24.0$ min, 1.0 mg) (Anexo 51).

Con el objetivo de determinar la actividad antimicrobiana de los extractos y los compuestos puros de PNM-9, un ensayo de actividad antimicrobiana contra las bacterias fitopatógenas *B. glumae* (ATCC 33617) y *B. gladioli* (3704-1-FEDEARROZ) fue realizado en placas de 96 pozos [195].

Para esto, una solución (2 mg/mL) de los extractos obtenidos durante los 15 días de incubación en los cuatro medios de cultivo fue usada. 200 μ L de cada solución de extracto fue añadida a 190 μ L de medio KB y 10 μ L de *B. glumae* (Absorbancia $\lambda_{600\text{ nm}} = 0,25$) fueron inoculados en la primera línea vertical de la caja de 96 pozos. Cuatro diluciones fueron realizadas, usando los primeros pozos como la solución concentrada; con el fin de obtener cinco concentraciones diferentes en cada pozo: 500 μ g/ml, 250 μ g/ml, 125 μ g/ml, 62,5 μ g/ml and 32,25 μ g/ml. 20 μ L de una solución del extracto orgánico de los blancos de medio cultivo y 20 μ L de una solución de MeOH al 10% en agua estéril fueron usados como control negativo. Del mismo modo, 10 μ L de gentamicina (20 μ g/mL) fueron usados como control positivo. Las placas fueron incubadas estacionariamente a 37°C por 24 horas, y las diferencias en los patrones de crecimiento fueron medidas por su absorbancia a $\lambda_{600\text{ nm}}$ y confirmada por inspección visual del crecimiento macroscópico en la placa de 96 pozos [195].

En todos los casos, la absorbancia obtenida del control negativo (solución de MeOH 10%) fue usada como el valor del 100% de crecimiento y utilizada para determinar el porcentaje de supervivencia bacteriano así:

$$\text{Porcentaje de supervivencia} = (\text{OD}_{\text{muestra}} - \text{OD}_{\text{pos}}) / (\text{OD}_{\text{neg}} - \text{OD}_{\text{pos}}) \times 100$$

Donde, $\text{OD}_{\text{muestra}}$, OD_{neg} y OD_{pos} , corresponde a la absorbancia de cada concentración evaluada, control de negativo y control positivo respectivamente.

Del mismo modo, los compuestos purificados fueron probados siguiendo un método similar. Brevemente, seis diluciones seriadas fueron realizadas usando los primeros pozos como solución concentrada, con el objetivo de obtener seis concentraciones diferentes en cada pozo: 500 μ g/ml, 250 μ g/ml, 125 μ g/ml, 62.5 μ g/ml and 32.25 μ g/ml, 16.12 μ g/ml and 8.1 μ g/ml. 20 μ L de una solución de MeOH al 10% y 10 μ L de gentamicina 20 μ g/mL fueron usados como

controles negativo y positivo, respectivamente. Las placas fueron incubadas estacionariamente a 37°C por 24 h y el crecimiento de *B. glumae* fue determinado por su absorbancia como se describió previamente.

En este caso, la concentración mínima inhibitoria de los compuestos purificados fue definida como la concentración más baja (en mg.l⁻¹) del compuesto antimicrobiano que generó una reducción de al menos el 90% del crecimiento de la bacteria fitopatógena en comparación con el control negativo.

8. Conclusiones y recomendaciones

Se logró aislar y conservar una colección de 203 microorganismos recuperados de 23 muestras de algas, esponjas, octocorales y sedimentos. De estos aislamientos 24 fueron identificados como *Actinobacterias* apoyados en las propiedades morfológicas macroscópicas y microscópicas, pruebas bioquímicas, marcadores quimiotaxonómicos y en la secuenciación del gen 16S rRNA y por su perfil proteico obtenido por MALDI-TOF. Los aislamientos pertenecen a los géneros *Streptomyces* (22), *Gordonia* (1) y *Micromonospora* (1). De acuerdo con el límite actual de la circunscripción de una especie procariota basada en la secuencia del 16S, el aislamiento PNM-25 podría ser una especie nueva. Se recomienda avanzar en la identificación de las cepas al nivel de especie, así como en la identificación de los otros aislamientos que hacen parte de la colección aquí obtenida. Para futuros estudios se recomienda combinar el tratamiento de carbonato de calcio con otros pre-tratamientos enfocados al enriquecimiento de las muestras en actinobacterias raras y que permitan disminuir la flora acompañante.

Los extractos orgánicos y acuosos obtenidos de la colección, fueron evaluados como fuente de compuestos con actividad antimicrobiana frente a las bacterias fitopatógenas del arroz *Burkholderia plantarii* ATCC 43733, *B. glumae* ATCC 33617 y *B. gladiol* CIAT 3704-1 y frente a los hongos *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* raza 2 (patógeno de clavel) y *Colletotrichum gloeosporioides* 26B (patógeno del ñame), logrando identificar aislamientos con actividad de amplio espectro, en la que algunos extractos como el obtenido de *Streptomyces* sp. PNM-161a logró controlar a 3 de los 5 patógenos evaluados, y extractos como el obtenido de *Streptomyces* sp. PNM-5 que presentó alta especificidad por el control de uno solo de los fitopatógenos evaluados. Se recomienda evaluar la capacidad para controlar estos fitopatógenos con las otras bacterias aisladas en el cepario, así como también realizar la evaluación de la actividad contra otros fitopatógenos de interés. También se recomienda evaluar la potencial aplicación

farmacología de los extractos y compuestos de estas bacterias en ensayos de citotoxicidad, actividad antiviral, antiparasitaria, entre otros ensayos.

El perfilado metabólico de los 24 aislamientos de actinobacterias empleando HCA, OPLS-DA y la estrategia del barcoding permitió evaluar la diversidad metabólica de los extractos orgánicos, encontrando aislamientos de alta diversidad metabólica como *Streptomyces* sp PNM-208, a la vez que se encontraron aislamientos como *Streptomyces* sp. PNM-9, de baja diversidad química. La identificación preliminar de compuestos utilizando estrategias de derreplicación contra la base de datos Antimarin y Marinlit, sugiere que *Streptomyces* sp PNM-208, es una fuente rica en metabolitos secundarios, diferentes a los encontrados en los otros aislamientos estudiados.

Con el desarrollo de una estrategia de integración del perfilado metabólico, la taxonomía y la bioactividad de las 24 cepas de actinobacterias recuperadas de ambientes marinos, en conjunto con los procesos de derreplicación, se seleccionaron cinco cepas de actinobacterias *Streptomyces* sp. PNM-161a, *Streptomyces* sp. PNM-208, *Streptomyces* sp. PNM-9, *Streptomyces* sp. PNM-182 y *Streptomyces* sp. PNM-5, como fuente de compuestos para el control de fitopatógenos.

A partir del extracto orgánico del *Streptomyces* sp PNM-161a se logró el aislamiento y la identificación de siete compuestos entre ellos dos tetrapéptidos cíclicos *ciclo*-[L-Phe-L-Pro-L-Leu-L-Pro] **5.1**, *ciclo*-[L-Phe-L-Pro-L-Ile-L-Pro] **5.2**, junto con cinco dicetopiperazinas *ciclo*-[L-Phe-D-Pro] **5.3**, y *ciclo*-[L-Phe-L-Pro] **5.4**, *ciclo*-[L-Pro-L-Leu] **5.5**, *ciclo*-[L-Pro-L-Met] **5.6** y *ciclo*-[L-Tyr-L-Pro] **5.7**. La estructura de los compuestos fue establecida por RMN 1D y 2D, MS, apoyados en la aplicación del método de marfey y la rotación óptica para la asignación de la configuración absoluta. Los compuestos puros también fueron evaluados contra los fitopatógenos antes mencionados encontrando que los compuestos más activos fueron el tetrapéptido *ciclo*-[L-Phe-L-Pro-L-Leu-L-Pro] **5.1** (*B. gladioli* MIC = 0.068 mM; *B. glumae* MIC = 1.1 mM) y la dicetopiperazina *ciclo*-(L-Pro-L-Leu) compuesto **5.5** (*B. gladioli* MIC = 0.3 mM; *B. glumae* MIC = 2.4 mM), además de otros compuestos con actividad moderada. Adicionalmente, los compuestos **5.1** y **5.2** fueron evaluados contra el hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* encontrando que el compuesto **5.1** logró una reducción del

65% en la supervivencia celular de los conidios del hongo a una concentración de 1.1 mM, mientras que el compuesto **5.2** logró una reducción del 50% en el mismo ensayo.

A partir del extracto orgánico de *Streptomyces* sp. PNM-208 se logró el aislamiento e de seis compuestos pertenecientes a la familia de las antimicinas identificados como la urauchimicina A **6.1**, urauchimicina C **6.2**, deisovalerilblastmicina **6.3**, antimicina A_{6a} **6.4**, la mezcla de las antimicinas A_{5a} **6.5** y a A_{5b} **6.6**, junto con dos dicetopiperazinas identificadas como Brevinamida F **6.6** y *ciclo*-[Phe-Pro] **6.7**. Los compuestos **6.1**, **6.3**, **6.4** y la **mezcla 6.5** presentaron actividad antifúngica contra el hongo fitopatógeno *C. gloeosporioides* con un porcentaje de germinación entre 0 y 4% mientras que el compuesto **6.2** presentó una inhibición del 50% en el ensayo de germinación de conidias.

En el estudio químico de la cepa *Streptomyces* sp. PNM-9 se emplearon herramientas de análisis multivariado con el fin de correlacionar el perfilado metabólico por RMN con su actividad contra los fitopatógenos del arroz *B. glumae* y *B. gladioli*. Se logró la identificación de los compuestos 2-metil-*N*-(2'-feniletíl)-butanamida **7.1** y la 3-metil-*N*-(2'-feniletíl)-butanamida **7.2** a partir del extracto orgánico de la fermentación en medio TSB y LB luego de 15 días de cultivo. La estructura de estos dos compuestos se confirmó luego de su aislamiento y análisis por experimentos de RMN 1D, 2D y MS. Estos compuestos mostraron una MIC de 2.43 mM y 1.21 mM respectivamente contra el fitopatógeno *B. glumae*.

Luego de identificar los principales compuestos responsables de la actividad biológica para estos tres aislamientos, se recomienda evaluar el efecto de las condiciones de cultivo (medios de cultivo, volumen de cultivo, temperatura, agitación, pH, co-cultivos, entre otros) en la producción de estos compuestos.

En cuanto a su posible uso como biocontrolador de fitopatógenos, se recomienda evaluar las cepas seleccionadas en ensayos de invernadero y en ensayos de campo para determinar si pueden o no colonizar plantas y mostrar su efecto biocontrolador. También se recomienda evaluar la eficacia y seguridad de su aplicación en pruebas en invernadero y en campo.

Debido a que muchas de las cepas aquí estudiadas presentaron también actividad biológica en su extracto acuoso, se recomienda continuar con el estudio químico del mismo para determinar cuáles compuestos son los responsables de la actividad biológica.

Con esta investigación se contribuyó al inventario de especies de nuestro país y al estudio de la biodiversidad de los ambientes marinos colombianos, una fuente de riqueza que hasta ahora se empieza a explotar y representa una primera aproximación para establecer el potencial biotecnológico de la colección de actinobacterias aisladas de ambientes marinos para su uso en el control de fitopatógenos.

9. Referencias

- [1] Y. Pinzón, "Caracterización morfológica y molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de ñame (*Dioscorea* spp.) y establecimiento de una escala de virulencia para su caracterización patogénica," Bogotá D.C. Universidad Nacional de Colombia.
- [2] M. Moreno-Moran and O. Burbano-Figueroa, "First Report of *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* Causing Cotton Ramulosis in Colombia," *Plant Dis.*, vol. 100, no. 3, pp. 653–653, Mar. 2016.
- [3] J.-H. Yang, W.-W. Zhang, Y.-Q. Zhuang, and T. Xiao, "Biocontrol activities of bacteria from cowdung against the rice sheath blight pathogen," *J. Plant Dis. Prot.*, vol. 124, no. 2, pp. 131–141, Apr. 2017.
- [4] J. W.-F. Law *et al.*, "The potential of *Streptomyces* as biocontrol agents against the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae* (*Pyricularia oryzae*)," *Front. Microbiol.*, vol. 8, no. January, p. 3, 2017.
- [5] W. Aktar, D. Sengupta, and A. Chowdhury, "Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards," *Interdiscip. Toxicol.*, vol. 2, no. 1, pp. 1–12, 2009.
- [6] S. Jogaiah, M. Kurjogi, S. R. Govind, S. S. Huntrike, V. A. Basappa, and L.-S. P. Tran, "Isolation and evaluation of proteolytic actinomycete isolates as novel inducers of pearl millet downy mildew disease protection," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 30789, 2016.
- [7] G. W. Gribble, "Biological activity of recently discovered halogenated marine natural products," *Marine Drugs*, vol. 13, no. 7. pp. 4044–4136, 2015.
- [8] D. J. Newman, "Pharmacology & Therapeutics Developing natural product drugs : Supply problems and how they have been overcome," *Pharmacol. Ther.*, 2015.
- [9] J. W. Blunt, B. R. Copp, R. A. Keyzers, M. H. G. Munro, and M. R. Prinsep, "Marine natural products," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 34, no. 3, pp. 235–294, 2017.
- [10] Y. Deng, X. Zhang, and X. Zhang, "Recent advances in genetic modification systems for Actinobacteria," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 101, no. 6. pp. 2217–

- 2226, 2017.
- [11] E. A. Barka *et al.*, "Taxonomy, Physiology, and Natural Products of *Actinobacteria*," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 80, no. 1, pp. 1–43, 2016.
- [12] C. Wu, Y. H. Choi, and G. P. van Wezel, "Metabolic profiling as a tool for prioritizing antimicrobial compounds," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 43, no. 2–3, pp. 299–312, 2016.
- [13] U. R. Abdelmohsen, K. Bayer, and U. Hentschel, "Diversity, abundance and natural products of marine sponge-associated actinomycetes," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 31, no. 3, pp. 381–99, 2014.
- [14] Y. Hou *et al.*, "Microbial strain prioritization using metabolomics tools for the discovery of natural products," *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 10, pp. 4277–4283, 2012.
- [15] D. Forner, F. Berru , H. Correa, K. Duncan, and R. G. Kerr, "Chemical dereplication of marine actinomycetes by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry profiling and statistical analysis," *Anal. Chim. Acta*, vol. 805, pp. 70–79, 2013.
- [16] D. Tripathi, "Bacterial Pathogens in Plants," *J. Bacteriol. Mycol. Open Access*, vol. 4, no. 2, pp. 1–2, 2017.
- [17] B. Lugtenberg, "Phytopathogenic Bacteria" *Agriculture. Frontiers in Plant Science*, vol. 6 pp. 986, 2015;
- [18] J. J. Heinis, "A Review of 'Plant Bacteriology,'" *J. Agric. Food Inf.*, vol. 12, no. 3–4, pp. 367–368, Jul. 2011.
- [19] E. Bray Speth, Y. N. Lee, and S. Y. He, "Pathogen virulence factors as molecular probes of basic plant cellular functions," *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 10, no. 6. pp. 580–586, 2007.
- [20] S. Leonard, F. Hommais, W. Nasser, and S. Reverchon, "Plant–phytopathogen interactions: bacterial responses to environmental and plant stimuli," *Environmental Microbiology*, vol. 19, no. 5. pp. 1689–1716, 2017.

- [21] J. Mansfield *et al.*, "Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology," *Molecular Plant Pathology*, vol. 13, no. 6. pp. 614–629, 2012.
- [22] M. C. Fisher *et al.*, "Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health," *Nature*, vol. 484, no. 7393. pp. 186–194, 2012.
- [23] D. Balmer, C. Planchamp, and B. Mauch-Mani, "On the move: induced resistance in monocots," *J. Exp. Bot.*, vol. 64, no. 5, pp. 1249–1261, Mar. 2013.
- [24] R. Dean *et al.*, "The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology," *Mol. Plant Pathol.*, vol. 13, no. 4, pp. 414–430, 2012.
- [25] F. Martinelli *et al.*, "Advanced methods of plant disease detection. A review," *Agron. Sustain. Dev.* 35: 1, 2015.
- [26] E. Fattahi, M. Mousavi Moghadam, and R. Khanbabaei, "The Effect of Tricyclazole on Testosterone Changes and Testicular Structure in Mice," *J. Babol Univ. Med. Sci.*, vol. 17, no. 2, pp. 43–49, 2015.
- [27] H. Kato, "Rice blast disease," *Pestic. Outlook*, vol. 12, no. 1, pp. 23–25, Jan. 2001.
- [28] J. E. Casida, "The greening of pesticide-environment interactions: Some personal observations," *Environ. Health Perspect.*, vol. 120, no. 4, pp. 487–493, 2012.
- [29] S. Y. Baek, J. Jurng, and Y. S. Chang, "Spatial distribution of polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, and dechlorane plus in Northeast Asia," *Atmos. Environ.*, vol. 64, pp. 40–46, 2013.
- [30] M. Kos, J. J. A. van Loon, M. Dicke, and L. E. M. Vet, "Transgenic plants as vital components of integrated pest management," *Trends Biotechnol.*, vol. 27, no. 11, pp. 621–627, 2009.
- [31] J. G. Lundgren, A. J. Gassmann, J. Bernal, J. J. Duan, and J. Ruberson, "Ecological compatibility of GM crops and biological control," *Crop Protection*, vol. 28, no. 12. pp. 1017–1030, 2009.
- [32] T. Soil-borne, C. M. J. Pieterse, R. De Jonge, and R. L. Berendsen, "Spotlight Supremacy,"

- Trends Plant Sci.*, vol. 21, no. 3, pp. 171–173, 2016.
- [33] M. O'Callaghan, "Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 100, no. 13. Springer Verlag, pp. 5729–5746, 01-Jul-2016.
- [34] C. D. S. Sousa, A. C. F. Soares, and M. D. S. Garrido, "Characterization of streptomycetes with potential to promote plant growth and biocontrol," *Sci. Agric.*, vol. 65, no. February, pp. 50–55, 2008.
- [35] M. K. Rai, R. K. Kalia, R. Singh, M. P. Gangola, and A. K. Dhawan, "Developing stress tolerant plants through in vitro selection-An overview of the recent progress," *Environ. Exp. Bot.*, vol. 71, no. 1, pp. 89–98, 2011.
- [36] I. Chet and J. Inbar, "Biological control of fungal pathogens," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 48, pp. 37–43, 1994.
- [37] S. A. Palaniyandi, S. H. Yang, L. Zhang, and J.-W. Suh, "Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 97, no. 22, pp. 9621–9636, Nov. 2013.
- [38] M. Kamjam, P. Sivalingam, Z. Deng, and K. Hong, "Deep sea actinomycetes and their secondary metabolites," *Frontiers in Microbiology*, vol. 8, 2017.
- [39] P. G. Williams, "Panning for chemical gold : marine bacteria as a source of new therapeutics," no. November 2008, pp. 45–52, 2017.
- [40] Y. Q. Zhang *et al.*, "Diversity of culturable actinobacteria from Qinghai-Tibet plateau, China," in *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 2010, vol. 98, no. 2, pp. 213–223.
- [41] P. C. Still, T. A. Johnson, C. M. Theodore, S. T. Loveridge, and P. Crews, "Scrutinizing the Scaffolds of Marine Biosynthetics from Different Source Organisms: Gram-Negative Cultured Bacterial Products Enter Center Stage," *J. Nat. Prod.*, vol. 77, no. 3, pp. 690–702, Mar. 2014.

- [42] J. W. Blunt, B. R. Copp, R. A. Keyzers, and M. H. G. Munro, "Natural Product Reports," no. Section 2, pp. 382–431, 2016.
- [43] D. J. Newman and G. M. Cragg, "Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010," *Journal of Natural Products*, vol. 75, no. 3, pp. 311–335, 2012.
- [44] A. Gomathi and K. M. Gothandam, "Ocean Dwelling *Actinobacteria* as Source of Antitumor Compounds," *Brazilian Arch. Biol. Technol.*, vol. 59, 2016.
- [45] S. Sudek *et al.*, "Identification of the putative bryostatin polyketide synthase gene cluster from 'Candidatus Endobugula sertula', the uncultivated microbial symbiont of the marine bryozoan *Bugula neritina*," *J. Nat. Prod.*, vol. 70, no. 1, pp. 67–74, 2007.
- [46] G. E. Vallad *et al.*, "Comparison of kasugamycin to traditional bactericides for the management of bacterial spot on tomato," *HortScience*, vol. 45, no. 12, pp. 1834–1840, 2010.
- [47] E. A. Lilla and K. Yokoyama, "Carbon extension in peptidynucleoside biosynthesis by radical SAM enzymes," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 12, no. 11, pp. 905–907, 2016.
- [48] G. Y. Tan, Y. Peng, C. Lu, L. Bai, and J. J. Zhong, "Engineering validamycin production by tandem deletion of γ -butyrolactone receptor genes in *Streptomyces hygroscopicus* 5008," *Metab. Eng.*, vol. 28, pp. 74–81, 2015.
- [49] S. Yin *et al.*, "Improvement of oxytetracycline production mediated via cooperation of resistance genes in *Streptomyces rimosus*," *Sci. China Life Sci.*, vol. 60, no. 9, pp. 992–999, 2017.
- [50] H. Takano *et al.*, "An ABC transporter involved in the control of streptomycin production in *Streptomyces griseus*," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 363, no. 14, 2016.
- [51] A.-C. Letzel, S. J. Pidot, and C. Hertweck, "A genomic approach to the cryptic secondary metabolome of the anaerobic world," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 30, no. 3, pp. 392–428, 2013.
- [52] P. Monciardini, M. Iorio, S. Maffioli, M. Sosio, and S. Donadio, "Discovering new bioactive molecules from microbial sources," *Microb. Biotechnol.*, vol. 7, no. 3, pp. 209–

- 220, 2014.
- [53] F. J. Reen, S. Romano, A. D. W. Dobson, and F. O. Gara, "The Sound of Silence: Activating Silent Biosynthetic Gene Clusters in Marine Microorganisms," pp. 4754–4783, 2015.
- [54] J. S. Zarins-Tutt *et al.*, "Prospecting for new bacterial metabolites: a glossary of approaches for inducing, activating and upregulating the biosynthesis of bacterial cryptic or silent natural products," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 33, no. 1, pp. 54–72, 2016.
- [55] a. m. g. Jongsik Chun, l Linda L.Blackall, Sa-ouk Kang, Yung Chil Hah, "a Proposal To Reclassify *Nocardia pinensis* Blackall et al. as *Skermania piniformis* gen. nov., comb. nov.," *Int. J. Syst. Bacteriol.*, pp. 127–131, 1997.
- [56] W. Ludwig *et al.*, "Road map of the phylum *Actinobacteria*," in *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, 2012, pp. 1–28.
- [57] K. Flärdh and M. J. Buttner, "*Streptomyces morphogenetics*: Dissecting differentiation in a filamentous bacterium," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 7, no. 1. pp. 36–49, 2009.
- [58] H. Xu, K. F. Chater, Z. Deng, and M. Tao, "A cellulose synthase-like protein involved in hyphal tip growth and morphological differentiation in streptomyces," *J. Bacteriol.*, vol. 190, no. 14, pp. 4971–4978, 2008.
- [59] K. F. Chater, "*Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics," *Philos. Trans. R. Soc. B*, vol. 361, no. 1469, pp. 761–8, 2006.
- [60] K. Horikoshi, *Extremophiles handbook*. Springer, 2011.
- [61] T. Siegl and A. Luzhetskyy, "Actinomycetes genome engineering approaches," *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 102, no. 3, pp. 503–516, 2012.
- [62] X. Zhou *et al.*, "New anti-infective cycloheptadepsipeptide congeners and absolute stereochemistry from the deep sea-derived *Streptomyces drozdowiczii* SCSIO 10141," *Tetrahedron*, vol. 70, no. 42, pp. 7795–7801, 2014.
- [63] A. Boissonnas, A. Scholer-dahire, L. Fetler, and S. Amigorena, *How to Overcome the Antibiotic Crisis*, vol. 398. 2016.

- [64] E. Helmke and H. Weyland, "*Rhodococcus marinonascens* sp. nov. an Actinomycete from the Sea," *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 34, no. 2, pp. 127–138, 1984.
- [65] M. A. Moran, L. T. Rutherford, and R. E. Hodson, "Evidence for indigenous *Streptomyces* populations in a marine environment determined with a 16S rRNA probe," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 61, no. 10, pp. 3695–3700, 1995.
- [66] P. R. Jensen, E. Gontang, C. Mafnas, T. J. Mincer, and W. Fenical, "Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments," *Environ. Microbiol.*, vol. 7, no. 7, pp. 1039–1048, 2005.
- [67] N. a Magarvey *et al.*, "Isolation and Characterization of Novel Marine-Derived Actinomycete Taxa Rich in Bioactive Metabolites Isolation and Characterization of Novel Marine-Derived Actinomycete Taxa Rich in Bioactive Metabolites †," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, no. 12, pp. 7520–7529, 2004.
- [68] L. A. Maldonado *et al.*, "*Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae*," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 55, no. 5, pp. 1759–1766, 2005.
- [69] M. Wietz, K. Duncan, N. V. Patin, and P. R. Jensen, "Antagonistic Interactions Mediated by Marine Bacteria: The Role of Small Molecules," *J. Chem. Ecol.*, vol. 39, no. 7, pp. 879–891, 2013.
- [70] H. P. Grossart, A. Schlingloff, M. Bernhard, M. Simon, and T. Brinkhoff, "Antagonistic activity of bacteria isolated from organic aggregates of the German Wadden Sea," *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 47, no. 3, pp. 387–396, 2004.
- [71] D. I. Kurtböke, "Biodiscovery from rare actinomycetes: An eco-taxonomical perspective," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 93, no. 5, pp. 1843–1852, 2012.
- [72] M. A. Fischbach and C. T. Walsh, "Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: Logic machinery, and mechanisms," *Chemical Reviews*, vol. 106, no. 8, pp. 3468–3496, 2006.
- [73] Y. Song *et al.*, "Cytotoxic and antibacterial angucycline- and prodigiosin-analogues

- from the deep-sea derived *Streptomyces* sp. SCSIO 11594," *Mar. Drugs*, vol. 13, no. 3, pp. 1304–1316, 2015.
- [74] S. Y. Jeong, H. J. Shin, T. S. Kim, H. S. Lee, S. K. Park, and H. M. Kim, "Streptokordin, a new cytotoxic compound of the methylpyridine class from a marine-derived *Streptomyces* sp. KORDI-3238," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 59, no. 4, pp. 234–240, 2006.
- [75] S. E. Helaly, A. Pesic, H. P. Fiedler, and R. D. Süßmuth, "Elaiomycins B and C: Alkylhydrazide antibiotics from *Streptomyces* sp. BK 190," *Org. Lett.*, vol. 13, no. 5, pp. 1052–1055, 2011.
- [76] A. W. Schultz *et al.*, "Biosynthesis and structures of cyclomarins and cyclomarazines, prenylated cyclic peptides of marine actinobacterial origin," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, no. 13, pp. 4507–4516, 2008.
- [77] B. S. Moore, J. A. Trischman, D. Seng, D. Kho, P. R. Jensen, and W. Fenical, "Salinamides, antiinflammatory depsipeptides from a marine streptomycete," *J. Org. Chem.*, vol. 64, no. 4, pp. 1145–1150, 1999.
- [78] R. P. Maskey *et al.*, "Anti-cancer and antibacterial trioxacarcins with high anti-malaria activity from a marine Streptomycete and their absolute stereochemistry," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 57, no. 12, pp. 771–779, 2004.
- [79] R. W. Burg *et al.*, "Avermectins , New Family of Potent Anthelmintic Agents : Producing Organism and Avermectins , New Family of Potent Anthelmintic Agents : Producing Organism and Fermentation," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 15, no. 3, pp. 361–367, 1979.
- [80] J. Riedlinger *et al.*, "Abyssomicins, Inhibitors of the para-Aminobenzoic Acid Pathway Produced by the Marine *Verrucosipora* Strain AB-18-032," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 57, no. 4, pp. 271–279, 2004.
- [81] R. Lacret *et al.*, "New ikarugamycin derivatives with antifungal and antibacterial properties from *Streptomyces zhaozhouensis*," *Mar. Drugs*, vol. 13, no. 1, pp. 128–140, 2015.

- [82] J. C. Carlson, S. Li, D. A. Burr, and D. H. Sherman, "Isolation and characterization of tirandamycins from a marine-derived *Streptomyces* sp.," *Journal of Natural Products*, vol. 72, no. 11, pp. 2076–2079, 2009.
- [83] R. P. Maskeya *et al.*, "Chandrananimycins A-C: Production of novel anticancer antibiotics from a marine actinomadura sp. isolate M048 by variation of medium composition and growth conditions," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 56, no. 7, pp. 622–629, 2003.
- [84] S. Sunagawa *et al.*, "Structure and function of the global ocean microbiome," *Science (80-.)*, vol. 348, no. 6237, 2015.
- [85] S.-K. Kim, *Marine microbiology : bioactive compounds and biotechnological applications*. Bioactive Compounds from Marine Actinomycetes 207.
- [86] C. Y. Huang, C. H. Ho, C. J. Lin, and C. C. Lo, "Exposure effect of fungicide kasugamycin on bacterial community in natural river sediment," *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes*, vol. 45, no. 5, pp. 485–491, 2010.
- [87] C. Lange *et al.*, "Effects of kasugamycin on the translome of *Escherichia coli*," *PLoS One*, vol. 12, no. 1, 2017.
- [88] A. Yoshii, H. Moriyama, and T. Fukuhara, "The novel kasugamycin 2'-N-acetyltransferase gene aac(2')-IIa, carried by the IncP Island, confers kasugamycin resistance to rice-pathogenic bacteria," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 78, no. 16, pp. 5555–5564, Aug. 2012.
- [89] "Arysta LifeScience Introduces KASUMIN™ Bactericide in Canada." [En linea] Disponible en: <http://www.arysta-na.com/ca/products/agriculture/kasumin/overview.html>
- [90] K. Isono, J. Nagatsu, K. Kobinata, K. Sasaki, and S. Suzuki, "Studies on polyoxins, antifungal antibiotics," *Agric. Biol. Chem.*, vol. 31, no. 2, pp. 190–199, 1967.
- [91] H. Q. Pan *et al.*, "Identification and characterization of the antifungal substances of a novel *Streptomyces cavourensis* NA4S," *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 25, no. 3, pp. 353–

- 357, 2015.
- [92] J. Li, C. Lu, and Y. Shen, "Macrolides of the bafilomycin family produced by *Streptomyces* sp. CS," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 63, no. 10, pp. 595–599, 2010.
- [93] S. Smaoui *et al.*, "Taxonomy, purification and chemical characterization of four bioactive compounds from new *Streptomyces* sp. TN256 strain," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 28, no. 3, pp. 793–804, 2012.
- [94] P. Wattana-amorn, W. Charoenwongsa, C. Williams, M. P. Crump, and B. Apichaisataienchote, "Antibacterial activity of *cyclo* (*L-Pro-L-Tyr*) and *cyclo* (*D-Pro-L-Tyr*) from *Streptomyces* sp . strain 22-4 against phytopathogenic bacteria," vol. 6419, no. October, pp. 0–4, 2015.
- [95] P. Tabares, S. M. Pimentel-Elardo, T. Schirmeister, T. Hünig, and U. Hentschel, "Anti-protease and Immunomodulatory Activities of Bacteria Associated with Caribbean Sponges," *Mar. Biotechnol.*, vol. 13, no. 5, pp. 883–892, Oct. 2011.
- [96] H. Correa *et al.*, "Rápida construcción de una librería de los productos de cultivo de 14 bacterias del phylum *Firmicutes* simbiontes del octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* de la isla de Providencia (Caribe Sur-occidental)," *Rev. la Acad. Colomb. Ciencias Exactas, Físicas y Nat.*, vol. XXXV, no. 136, pp. 337–348, 2011.
- [97] D. Martínez-Matamoros, M. Laiton Fonseca, C. Duque, F. A. Ramos, and L. Castellanos, "Búsqueda de bacterias marinas como fuente de inhibidores de quorum sensing (iqs): primer estudio químico de *Oceanobacillus profundus* (RKHC-62B)," *Rev. Vitae*, vol. 23, no. 1, pp. 30–47, Jul. 2016.
- [98] A. Pinzón-Espinosa *et al.*, "Cereusitin A, a cyclic tetrapeptide from a *Bacillus cereus* strain isolated from the soft coral *Antillogorgia* (syn. *Pseudopterogorgia*) *elisabethae*," *Tetrahedron Lett.*, vol. 58, no. 7, pp. 634–637, 2017.
- [99] R. I. Amann, W. Ludwig, and K. H. Schleifer, "Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation.," *Microbiol. Rev.*, vol. 59, no. 1, pp. 143–69, 1995.

- [100] I. Joint, M. Mühling, and J. Querellou, "Culturing marine bacteria - An essential prerequisite for biodiscovery: Minireview," *Microbial Biotechnology*, vol. 3, no. 5. pp. 564–575, 2010.
- [101] J. A. Gilbert *et al.*, "The seasonal structure of microbial communities in the Western English Channel," *Environ. Microbiol.*, vol. 11, no. 12, pp. 3132–3139, 2009.
- [102] M. Achtman and M. Wagner, "Microbial diversity and the genetic nature of microbial species," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 6, no. 6. pp. 431–440, 2008.
- [103] R. M. Morris *et al.*, "SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities," *Nature*, vol. 420, no. 6917, pp. 806–810, 2002.
- [104] R. H. Baltz, "*Streptomyces* and *Saccharopolyspora* hosts for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters," *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 37, no. 8. pp. 759–772, 2010.
- [105] K. B. Heidelberg, J. A. Gilbert, and I. Joint, "Marine genomics: At the interface of marine microbial ecology and biodiscovery: Minireview," *Microbial Biotechnology*, vol. 3, no. 5. pp. 531–543, 2010.
- [106] O. Prakash, Y. Nimonkar, and Y. S. Shouche, "Practice and prospects of microbial preservation," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 339, no. 1. pp. 1–9, 2013.
- [107] F. O. Glöckner and I. Joint, "Marine microbial genomics in Europe: current status and perspectives," *Microb. Biotechnol.*, vol. 3, no. 5, pp. 523–530, 2010.
- [108] T. P. Curtis, W. T. Sloan, and J. W. Scannell, "Estimating prokaryotic diversity and its limits," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 99, no. 16, pp. 10494–10499, 2002.
- [109] D. Smith and M. Ryan, "Implementing Best Practices and Validation of Cryopreservation Techniques for Microorganisms," *Sci. World J.*, vol. 2012, pp. 1–9, 2012.
- [110] M. C. D. Parra Huertas SL, Pérez Casas MM, Bernal Morales M, Suarez Moreno ZR, "Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la

- Universidad Nacional de Colombia (IBUN),” Universidad Nacional de Colombia, 2006.
- [111] M. de, “Fundamentos y técnicas para la preservación de bacterias, hongos y levaduras.” IBUN, Universidad Nacional de Colombia, 2006.
- [112] D. Smith, “Culture collections over the world,” *Int. Microbiol.*, vol. 6, no. 2, pp. 95–100, Jun. 2003.
- [113] WFCC, “World federation for culture collections guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganismS,” 2010. .
- [114] S. F. Perry, “Freeze-drying and cryopreservation of bacteria,” *Mol. Biotechnol.*, vol. 9, no. 1, pp. 59–64, Feb. 1998.
- [115] X. Tang and M. J. Pikal, “Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice,” *Pharm. Res.*, vol. 21, no. 2, pp. 191–200, Feb. 2004.
- [116] S. N. Filippova, N. A. Surgucheva, and V. F. Gal’chenko, “Long-term storage of collection cultures of actinobacteria,” *Microbiology*, vol. 81, no. 5, pp. 630–637, Sep. 2012.
- [117] Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, “Descripción del Banco de Germoplasma de Microorganismos.” [En línea] Disponible en:
<http://www.corpoica.org.co/bancos-de-germoplasma/bancomicroorganismos/descripcionmicroorganismos/>
- [118] Pontificia Universidad Javeriana, “Microorganismos | Pontificia Universidad Javeriana.” [En línea] Disponible en:
<http://ciencias.javeriana.edu.co/investigacion/colecciones-biologicas/microorganismos>
- [119] Universidad de Los Andes, “CIMIC-Centro de Investigaciones Microbiológicas.” [En línea] Disponible en: <https://cimic.uniandes.edu.co/>.
- [120] Universidad Católica de Manizales, “Colección de Microorganismos de la UCM » UCM.” [En línea] Disponible en: <http://www.ucm.edu.co/instituto-de-investigacion-en-microbiologia-y-biotecnologia-agroindustrial/coleccion-de-microorganismos-de-la->

ucm/

- [121] Instituto de Biotecnología (IBUN), "Banco de Cepas y Genes." [En línea] Disponible en: http://www.ibun.unal.edu.co/lineasGrupos/GruposTransversales/L&G_GT_Cepario.html
- [122] N. Pastrana-Camacho *et al.*, "Bioprospecting for culturable actinobacteria with antimicrobial properties isolated from rivers in Colombian Orinoquia," vol. 15, no. June, pp. 1259–1265, 2016.
- [123] Diaz Cardenas C, "Estudio de la composición de la comunidad bacteriana de manantiales salinos ubicados en los departamentos de Risaralda y Boyacá," Pontificia Universidad Javeriana., 2012.
- [124] Y. Posada *et al.*, "Cuantificación , aislamiento e identificación de comunidades anaerobias amilolíticas de un manantial termomineral de Paipa , Boyacá," *Rev. Colomb. Biotecnol.*, vol. 6, no. 2, pp. 90–100, 2004.
- [125] M. L. Gómez, C. Hurtado, J. Dussán, J. P. Parra, and S. Narváez, "Determination of the Ability To Degradate Persistent Organic Compounds By Marine Sediment Bacteria Isolated in the Colombian Caribbean," *Actual Biol*, vol. 85, no. 85, pp. 125–137, 2006.
- [126] R. M. Gulve and A. M. Deshmukh, "Antimicrobial activity of the marine actinomycetes," *Int. Multidiscip. Res. J.*, vol. 2, no. 3, pp. 16–22, 2012.
- [127] M. Otaguro, M. Hayakawa, T. Yamazaki, and Y. Iimura, "An integrated method for the enrichment and selective isolation of *Actinokineospora* spp. in soil and plant litter.," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 91, no. 1, pp. 118–30, Jul. 2001.
- [128] S. Qin *et al.*, "Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, no. 19, pp. 6176–86, Oct. 2009.
- [129] Baskaran, R., Vijayakumar, R., and Mohan, P. M., "Enrichment method for the isolation of bioactive actinomycetes from mangrove sediments of Andaman Islands, India," *Malays. J. Microbiol.*, Mar. 2011.

- [130] P. Saravana Kumar, V. Durairandiyan, and S. Ignacimuthu, "Isolation, screening and partial purification of antimicrobial antibiotics from soil *Streptomyces* sp. SCA 7," *Kaohsiung J. Med. Sci.*, vol. 30, no. 9, pp. 435–446, Sep. 2014.
- [131] M. L. Timmermans, Y. P. Paudel, and A. C. Ross, "Investigating the Biosynthesis of Natural Products from Marine Proteobacteria: A Survey of Molecules and Strategies," *Mar. Drugs*, vol. 15, no. 8, p. 235, Aug. 2017.
- [132] J. J. Arroyave-Toro, S. Mosquera, and V. Villegas-Escobar, "Biocontrol activity of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 cells and lipopeptides against postharvest fungal pathogens," *Biol. Control*, vol. 114, pp. 195–200, Nov. 2017.
- [133] L. A. Maldonado, D. Fragoso-Yez, A. Pérez-García, J. Rosell??n-Druker, and E. T. Quintana, "Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico," *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, vol. 95, no. 2, pp. 111–120, 2009.
- [134] C. Paulus *et al.*, "New natural products identified by combined genomics-metabolomics profiling of marine *Streptomyces* sp. MP131-18," *Sci. Rep.*, vol. 7, p. 42382, Feb. 2017.
- [135] C.-L. Yang *et al.*, "Strepchazolins A and B: Two New Alkaloids from a Marine *Streptomyces chartreusis* NA02069," *Mar. Drugs*, vol. 15, no. 8, p. 244, Aug. 2017.
- [136] M. S Brooks, T. J Burdock, and A. E Ghaly, "Changes in Cell Structure, Morphology and Activity of *Streptomyces venezuelae* during the Growth, Shocking and Jadomycin Production Stages," *J. Microb. Biochem. Technol.*, vol. 4, no. 3, pp. 63–75, 2012.
- [137] C. Cheng *et al.*, "Biodiversity, anti-trypanosomal activity screening, and metabolomic profiling of actinomycetes isolated from Mediterranean sponges," *PLoS One*, vol. 10, no. 9, pp. 1–21, 2015.
- [138] K. Cheng, X. Rong, A. A. Pinto-Tomás, M. Fernández-Villalobos, C. Murillo-Cruz, and Y. Huang, "Population genetic analysis of *Streptomyces albidoflavus* reveals habitat barriers to homologous recombination in the diversification of streptomycetes.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 81, no. 3, pp. 966–75, Feb. 2015.
- [139] S. K. Augustine, S. P. Bhavsar, and B. P. Kapadnis, "A non-polyene antifungal antibiotic

- from *Streptomyces albidoflavus* PU 23.," *J. Biosci.*, vol. 30, no. 2, pp. 201–11, Mar. 2005.
- [140] C. Viegelmann *et al.*, "Metabolomic profiling and genomic study of a marine sponge-associated *Streptomyces* sp.," *Mar. Drugs*, vol. 12, no. 6, pp. 3323–3351, 2014.
- [141] M. C. Cone, X. Yin, L. L. Grochowski, M. R. Parker, and T. M. Zabriskie, "The blasticidin S biosynthesis gene cluster from *Streptomyces griseochromogenes*: Sequence analysis, organization, and initial characterization," *ChemBioChem*, vol. 4, no. 9, pp. 821–828, 2003.
- [142] R. Solanki, M. Khanna, and R. Lal, "Bioactive compounds from marine actinomycetes.," *Indian J. Microbiol.*, vol. 48, no. 4, pp. 410–31, Dec. 2008.
- [143] T. Kaur and R. K. Manhas, "Antifungal, insecticidal, and plant growth promoting potential of *Streptomyces hydrogenans* DH16," *J. Basic Microbiol.*, vol. 54, no. 11, pp. 1175–1185, Nov. 2014.
- [144] J.-L. Sui *et al.*, "*Streptomyces sanyensis* sp. nov., isolated from mangrove sediment," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 61, no. 7, pp. 1632–1637, Jul. 2011.
- [145] T. Li *et al.*, "Cloning, Characterization and Heterologous Expression of the Indolocarbazole Biosynthetic Gene Cluster from Marine-Derived *Streptomyces sanyensis* FMA," *Mar. Drugs*, vol. 11, no. 2, pp. 466–488, Feb. 2013.
- [146] W.-J. Li *et al.*, "*Streptomyces canchipurensis* sp. nov., isolated from a limestone habitat," *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 106, no. 6, pp. 1119–1126, Dec. 2014.
- [147] X. Rong, J. R. Doroghazi, K. Cheng, L. Zhang, D. H. Buckley, and Y. Huang, "Classification of *Streptomyces* phylogroup pratensis (Doroghazi and Buckley, 2010) based on genetic and phenotypic evidence, and proposal of *Streptomyces pratensis* sp. nov.," *Syst. Appl. Microbiol.*, vol. 36, no. 6, pp. 401–407, Sep. 2013.
- [148] I. Schneemann, J. Wiese, A. L. Kunz, and J. F. Imhoff, "Genetic approach for the fast discovery of phenazine producing bacteria.," *Mar. Drugs*, vol. 9, no. 5, pp. 772–89, 2011.
- [149] S. Zhao *et al.*, "*Micromonospora parathelypteridis* sp. Nov., an endophytic actinomycete

- with antifungal activity isolated from the root of *parathelypteris beddomei* (Bak.) ching," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 67, no. 2, pp. 268–274, Feb. 2017.
- [150] K. Supong *et al.*, "*Micromonospora sediminicola* sp. nov., isolated from marine sediment," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 63, no. PART2, pp. 570–575, 2013.
- [151] A. M. Hirsch and M. Valdés, "Micromonospora: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels," *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 42, no. 4, pp. 536–542, 2010.
- [152] J. H. Cha and C. J. Cha, "*Gordonia alkaliphila* sp. nov., an actinomycete isolated from tidal flat sediment," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 63, no. 1, pp. 327–331, 2013.
- [153] A. B. Jackisch-Matsuura *et al.*, "Production and characterization of surface-active compounds from *Gordonia amicalis*," *Brazilian Arch. Biol. Technol.*, vol. 57, no. 1, pp. 138–144, 2014.
- [154] P. Yarza *et al.*, "Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 12, no. 9, pp. 635–645, Aug. 2014.
- [155] M. Christner *et al.*, "Rapid MALDI-TOF mass spectrometry strain typing during a large outbreak of Shiga-toxigenic *Escherichia coli*," *PLoS One*, vol. 9, no. 7, 2014.
- [156] J. F. Santos-Gandelman, M. Giambiagi-deMarval, W. M. R. Oelemann, and M. S. Laport, "Biotechnological potential of sponge-associated bacteria.," *Curr. Pharm. Biotechnol.*, vol. 15, no. 2, pp. 143–155, 2014.
- [157] L. Macintyre *et al.*, "Metabolomic tools for secondary metabolite discovery from marine microbial symbionts," *Mar. Drugs*, vol. 12, no. 6, pp. 3416–3448, Jun. 2014.
- [158] L. A. Betancur *et al.*, "Marine Actinobacteria as a source of compounds for phytopathogen control: An integrative metabolic-profiling / bioactivity and taxonomical approach," *PLoS One*, vol. 12, no. 2, p. e0170148, Feb. 2017.
- [159] M. Shepherd, "Laboratory maintenance of *Streptomyces* species," *Curr. Protoc*, pp. 1–

10, 2010.

- [160] E. B. Shirling and D. Gottlieb, "Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*.: II. Species descriptions from first study," *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 18, no. 2, pp. 69–189, 1968.
- [161] M. Goodfellow, Goodfellow, and Michael, "*Actinobacteria phyl. nov.*," in *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2015, pp. 1–2.
- [162] L. E. Espinoza, A. L. D. Baines, and K. L. Lowe, "Biochemical , Nutrient and Inhibitory Characteristics of *Streptomyces* Cultured From a Hypersaline Estuary , the Laguna Madre (Texas)," *Online J. Biol. Sci.*, vol. 13, no. 1, pp. 18–27, 2013.
- [163] J. L. Staneck and G. D. Roberts, "Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography.," *Appl. Microbiol.*, vol. 28, no. 2, pp. 226–231, 1974.
- [164] E. T. Quintana, R. F. Badillo, and L. A. Maldonado, "Characterisation of the first actinobacterial group isolated from a Mexican extremophile environment," *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, vol. 104, no. 1, pp. 63–70, 2013.
- [165] D. Prakash and N. N. Nawani, "A rapid and improved technique for scanning electron microscopy of actinomycetes," *J. Microbiol. Methods*, vol. 99, no. 1, pp. 54–57, 2014.
- [166] M. S Brooks, T. J Burdock, A. E Ghaly, and D. Dave, "Changes in Cell Structure, Morphology and Activity of *Streptomyces venezuelae* during the Growth, Shocking and Jadomycin Production Stages," *J. Microb. Biochem. Technol.*, vol. 4, no. 3, pp. 063–075, Apr. 2012.
- [167] S. Das, H. R. Dash, N. Mangwani, J. Chakraborty, and S. Kumari, "Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms," *J. Microbiol. Methods*, vol. 103, pp. 80–100, 2014.
- [168] R. Munoz *et al.*, "Release LTPs104 of the All-Species Living Tree," *Syst. Appl. Microbiol.*,

- vol. 34, no. 3, pp. 169–170, 2011.
- [169] W. Ludwig *et al.*, “ARB: A software environment for sequence data,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, no. 4, pp. 1363–1371, 2004.
- [170] J. O. Lay, “MALDI-TOF mass spectrometry and bacterial taxonomy,” *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 19, no. 8, pp. 507–516, 2000.
- [171] FAO, “FAO Rice Market Monitor (RMM), December 2017,” *FAO Rice Mark. Monit.*, vol. XX, no. 4, 2017.
- [172] G. Devescovi *et al.*, “Involvement of a quorum-sensing-regulated lipase secreted by a clinical isolate of *Burkholderia glumae* in severe disease symptoms in rice,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 15, pp. 4950–8, Aug. 2007.
- [173] R. Solis, I. Bertani, G. Degrassi, G. Devescovi, and V. Venturi, “Involvement of quorum sensing and RpoS in rice seedling blight caused by *Burkholderia plantarii*,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 259, no. 1, pp. 106–112, 2006.
- [174] CropLife Latin America, “Añublo bacterial de la panícula - CropLife Latin America.” [Online]. Available: <https://www.croplifela.org/es/plagas/listado-de-plagas/anublo-bacterial-de-la-panicula>. [Accessed: 13-Feb-2018].
- [175] H. Ardila and B. L. Higuera, “ β -1, 3-Glucanase Differential Induction in Carnation (*Dianthus caryophyllus*) Infected by *Fusarium oxysporum*,” *Acta Biológica Colomb.*, vol. 10, no. 2, pp. 61–74, 2005.
- [176] D. Barh, “Omics. Applications in Crop Science,” no. June, 2014.
- [177] Oregon State University, “Carnation (*Dianthus caryophyllus*)-Fusarium Wilt | Pacific Northwest Pest Management Handbooks.” [Online]. Available: <https://pnwhandbooks.org/node/2405/> print. [Accessed: 13-Feb-2018].
- [178] N. Giraldo Marroquín, S. L. Bustamante Rodríguez, Y. A. Pinzón Gutiérrez, and G. Buitrago Hurtado, “Caracterización molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de plantas de ñame de la Costa Atlántica Colombiana utilizando la técnica ‘DNA

- Amplification Fingerprinting (DAF),” *Rev. Colomb. Biotecnol.*, vol. 18, no. 1, pp. 95–103, 2016.
- [179] S. a Stephenson, J. Hatfield, a G. Rusu, D. J. Maclean, and J. M. Manners, “CgDN3: an essential pathogenicity gene of *Colletotrichum gloeosporioides* necessary to avert a hypersensitive-like response in the host *Stylosanthes guianensis*,” *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, vol. 13, no. 9, pp. 929–941, 2000.
- [180] P. F. Cannon, U. Damm, P. R. Johnston, and B. S. Weir, “*Colletotrichum* - current status and future directions,” *Stud. Mycol.*, vol. 73, pp. 181–213, 1986.
- [181] P. F. Cannon, U. Damm, P. R. Johnston, and B. S. Weir, “*Colletotrichum* - current status and future directions,” *Stud. Mycol.*, vol. 73, no. 1, pp. 181–213, Sep. 1986.
- [182] S. Zivkovic, S. Stojanovic, Z. Ivanovic, V. Gavrilovic, T. Popovic, and J. Balaz, “Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*,” *Arch. Biol. Sci.*, vol. 62, no. 3, pp. 611–623, 2010.
- [183] “Commercial Products and Biotechnology III Alcoholic Beverages and Biofuels 423 IV Products from Genetically Engineered Microorganisms 428 V Transgenic Eukaryotes 437.”
- [184] S. A. Palaniyandi, “Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion,” *Appl Microbiol Biotechnol.* vol. 97, no.22. pp. 9621-36 2013.
- [185] A. Sathya, R. Vijayabharathi, and S. Gopalakrishnan, “Plant growth-promoting actinobacteria: a new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes,” *3 Biotech*, vol. 7, no. 2. 2017.
- [186] A. A. Al-Askar, Y. M. Rashad, E. E. Hafez, W. M. Abdulkhair, Z. A. Baka, and K. M. Ghoneem, “Characterization of alkaline protease produced by *Streptomyces griseorubens* E44G and its possibility for controlling Rhizoctonia root rot disease of corn,” *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, vol. 29, no. 3, pp. 457–462, May 2015.
- [187] L. Shivilata and T. Satyanarayana, “Actinobacteria in agricultural and environmental sustainability,” in *Agro-Environmental Sustainability*, vol. 1, 2017, pp. 173–218.

- [188] Y. M. Rashad, A. A. Al-Askar, K. M. Ghoneem, W. I. A. Saber, and E. E. Hafez, "Chitinolytic *Streptomyces griseorubens* E44G enhances the biocontrol efficacy against Fusarium wilt disease of tomato," *Phytoparasitica*, vol. 45, no. 2, pp. 227–237, 2017.
- [189] S. S. Paulsen, B. Andersen, L. Gram, and H. MacHado, "Biological potential of chitinolytic marine bacteria," *Mar. Drugs*, vol. 14, no. 12, 2016.
- [190] A. E. M. S. Hosny and A. Abood, "A Potent Chitinolytic Activity of Marine Actinomyces sp. and Enzymatic Production of Chitooligosaccharides.," *Aust. J. basic Appl. Sci.*, vol. 4, no. 4, pp. 615–623, 2010.
- [191] "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing An informational supplement for global application developed through the Clinical and Laboratory Standards Institute."
- [192] J. B. J. and W. C. N. W. Schaad, "Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, Third Edition.," *Plant Pathol.*, vol. 50, no. 6, pp. 812–814, Dec. 2001.
- [193] H. S. Karki *et al.*, "Diversities in Virulence, Antifungal Activity, Pigmentation and DNA Fingerprint among Strains of *Burkholderia glumae*," *PLoS One*, vol. 7, no. 9, 2012.
- [194] G. S. Kanini, E. A. Katsifas, A. L. Savvides, and A. D. Karagouni, "*Streptomyces rochei* ACTA1551, an indigenous greek isolate studied as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*," *Biomed Res. Int.*, vol. Article ID, p. 10 pages, 2013.
- [195] M. Balouiri, M. Sadiki, and S. K. Ibnsouda, "Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review," *J. Pharm. Anal.*, vol. 6, no. 2, pp. 71–79, Apr. 2016.
- [196] J. C. Lindon, J. K. Nicholson, E. Holmes, and J. R. Everett, "Metabonomics: metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids," *Concepts Magn. Reson.*, vol. 12, no. 5, pp. 289–320, 2000.
- [197] B. Worley and R. Powers, "Multivariate Analysis in Metabolomics," *Curr. Metabolomics*, vol. 1, no. 1, pp. 92–107, 2012.

- [198] M. Y. Mushtaq, Y. H. Choi, R. Verpoorte, and E. G. Wilson, "Extraction for metabolomics: Access to the metabolome," *Phytochem. Anal.*, vol. 25, no. 4, pp. 291–306, 2014.
- [199] T. Gebregiworgis and R. Powers, "Application of NMR Metabolomics to Search for Human Disease Biomarkers," *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, vol. 15, no. 8, pp. 595–610, 2012.
- [200] K. M. Wilcoxon, T. Uehara, K. T. Myint, Y. Sato, and Y. Oda, "Practical metabolomics in drug discovery," *Expert Opin. Drug Discov.*, vol. 5, no. 3, pp. 249–263, 2010.
- [201] R. D. Hall, "Plant Metabolomics in a Nutshell: Potential and Future Challenges," in *Annual Plant Reviews Volume 43: Biology of Plant Metabolomics*, vol. 43, 2011, pp. 1–24.
- [202] B. Zhang and R. Powers, "Analysis of bacterial biofilms using NMR-based metabolomics," *Future Med. Chem.*, vol. 4, no. 10, pp. 1273–1306, Jun. 2012.
- [203] J. Tang, "Microbial Metabolomics," *Curr. Genomics*, vol. 12, no. 6, pp. 391–403, Sep. 2011.
- [204] W. B. Dunn and D. I. Ellis, "Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 24, no. 4, pp. 285–294, 2005.
- [205] H. Pearson, "Meet the human metabolome," *Nature*, vol. 446, no. 7131, p. 8, 2007.
- [206] D. S. Wishart *et al.*, "HMDB 3.0—The Human Metabolome Database in 2013," *Nucleic Acids Res.*, vol. 41, no. D1, pp. D801–D807, Nov. 2012.
- [207] C. Wu, H. K. Kim, G. P. Van Wezel, and Y. H. Choi, "Metabolomics in the natural products field - A gateway to novel antibiotics," *Drug Discov. Today Technol.*, vol. 13, pp. 11–17, 2015.
- [208] K. Dettmer, P. A. Aronov, and B. D. Hammock, "Mass spectrometry-based metabolomics," *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 26, no. 1, pp. 51–78, 2007.
- [209] J. Han, R. Datla, S. Chan, and C. H. Borchers, "Mass spectrometry-based technologies for high-throughput metabolomics," *Bioanalysis*, vol. 1, no. 9, pp. 1665–1684, 2009.

- [210] C. Wu, H. Zhu, G. P. van Wezel, and Y. H. Choi, "Metabolomics-guided analysis of isocoumarin production by *Streptomyces* species MBT76 and biotransformation of flavonoids and phenylpropanoids," *Metabolomics*, vol. 12, no. 5, pp. 1–11, 2016.
- [211] H. Mohimani and P. A. Pevzner, "Dereplication, sequencing and identification of peptidic natural products: from genome mining to peptidogenomics to spectral networks," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 33, no. 1, pp. 73–86, 2016.
- [212] R. D. Kersten *et al.*, "A mass spectrometry-guided genome mining approach for natural product peptidogenomics," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 7, no. 11, pp. 794–802, 2011.
- [213] H. S. Tapp and E. K. Kemsley, "Notes on the practical utility of OPLS," *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 28, no. 11, pp. 1322–1327, 2009.
- [214] M. Barker and W. Rayens, "Partial least squares for discrimination," *J. Chemom.*, vol. 17, no. 3, pp. 166–173, 2003.
- [215] S. Wold, M. Sjöström, and L. Eriksson, "PLS-regression: A basic tool of chemometrics," in *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2001, vol. 58, no. 2, pp. 109–130.
- [216] J.-L. Wolfender, G. Marti, and E. Ferreira Queiroz, "Advances in Techniques for Profiling Crude Extracts and for the Rapid Identification of Natural Products: Dereplication, Quality Control and Metabolomics," *Curr. Org. Chem.*, vol. 14, no. 16, pp. 1808–1832, 2010.
- [217] T. Ito and M. Masubuchi, "Dereplication of microbial extracts and related analytical technologies," *Journal of Antibiotics*, vol. 67, no. 5, pp. 353–360, 2014.
- [218] S. P. Gaudêncio and F. Pereira, "Dereplication: racing to speed up the natural products discovery process," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 32, no. 6, pp. 779–810, 2015.
- [219] V. Mapelli, L. Olsson, and J. Nielsen, "Metabolic footprinting in microbiology: methods and applications in functional genomics and biotechnology," *Trends in Biotechnology*, vol. 26, no. 9, pp. 490–497, 2008.
- [220] R. F. Seipke, "Strain-level diversity of secondary metabolism in *Streptomyces albus*,"

PLoS One, vol. 10, no. 1, 2015.

- [221] X. Zhou and W. Fenical, "The unique chemistry and biology of the piericidins," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 69, no. 8, pp. 582–593, Aug. 2016.
- [222] G. A. Conder *et al.*, "Anthelmintic activity of dioxapyrrolomycin," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 45, no. 6, pp. 977–83, Jun. 1992.
- [223] U. Gräfe, W. Schade, I. Eritt, W. F. Fleck, and L. Radics, "A new inducer of anthracycline biosynthesis from *Streptomyces viridochromogenes*," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 35, no. 12, pp. 1722–3, Dec. 1982.
- [224] S. Sakuda, S. Tanaka, K. Mizuno, O. Sukcharoen, T. Nihira, and Y. Yamada, "Biosynthetic studies on virginiae butanolide A, a butyrolactone autoregulator from *Streptomyces*. Part 2. Preparation of possible biosynthetic intermediates and conversion experiments in a cell-free system," *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, vol. 0, no. 19, p. 2309, Jan. 1993.
- [225] T. Řezanka, J. Spížek, V. Přikrylová, and V. M. Dembitsky, "Four New Derivatives of Trihomononactic Acids from *Streptomyces globisporus*," *European J. Org. Chem.*, vol. 2004, no. 20, pp. 4239–4244, Oct. 2004.
- [226] Y. Shigihara *et al.*, "6-Deoxy-8-O-methylrabelomycin and 8-O-methylrabelomycin from a *Streptomyces* species," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 41, no. 9, pp. 1260–4, Sep. 1988.
- [227] M. L. Gilpin, J. Balchin, S. J. Box, and J. W. Tyler, "MM 47755, a new benz[a]anthracene antibiotic from a streptomycete," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 42, no. 4, pp. 627–8, Apr. 1989.
- [228] S. Imai, A. Shimazu, K. Furihata, K. Furihata, Y. Hayakawa, and H. Seto, "Isolation and structure of a new phenoxazine antibiotic, exfoliazone, produced by *Streptomyces exfoliatus*," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 43, no. 12, pp. 1606–7, Dec. 1990.
- [229] Y. Q. Tang, I. Sattler, R. Thiericke, S. Grabley, and X. Z. Feng, "Feigrisolides A, B, C and D, new lactones with antibacterial activities from *Streptomyces griseus*," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 53, no. 9, pp. 934–43, Sep. 2000.

- [230] F. V. Ritacco, B. Haltli, J. E. Janso, M. Greenstein, and V. S. Bernan, "Dereplication of *Streptomyces* soil isolates and detection of specific biosynthetic genes using an automated ribotyping instrument," in *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2003, vol. 30, no. 8, pp. 472–479.
- [231] P. R. Jensen, P. G. Williams, D. C. Oh, L. Zeigler, and W. Fenical, "Species-specific secondary metabolite production in marine actinomycetes of the genus *Salinispora*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 4, pp. 1146–1152, 2007.
- [232] T. Pluskal, S. Castillo, A. Villar-Briones, and M. Oresic, "MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data," *BMC Bioinformatics*, vol. 11, p. 395, 2010.
- [233] A. D. GARDNER AND E. CHAIN., "Proactinomycin: A 'Bacteriostatic' Produced by a Species of Proactinomyces," *Br J Exp Path*, vol. 23, pp. 123–127, 1942.
- [234] L. L. Yan *et al.*, "Antimycin A 18 produced by an endophytic *Streptomyces albidoflavus* isolated from a mangrove plant," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 63, no. 5, pp. 259–261, 2010.
- [235] W. Rungprom *et al.*, "Cyclic tetrapeptides from marine bacteria associated with the seaweed *Digenea* sp. and the sponge *Halisarca ectofibrosa*," *Tetrahedron*, vol. 64, no. 14, pp. 3147–3152, 2008.
- [236] C. D. Song Huang, Weijia Ding, Chunyuan Li, "Two new cyclopeptides from the co-culture broth of two marine mangrove fungi and their antifungal activity," *Pharmacogn. Mag.*, vol. 10, no. 40, pp. 410–414, 2014.
- [237] X. Li, S. Dobretsov, Y. Xu, X. Xiao, O. Hung, and P. Y. Qian, "Antifouling diketopiperazines produced by a deep-sea bacterium, *Streptomyces fungicidicus*," *Biofouling*, vol. 22, no. 3, pp. 201–208, 2006.
- [238] J. Bao, X. Y. Zhang, X. Y. Xu, F. He, X. H. Nong, and S. H. Qi, "New cyclic tetrapeptides and asteltoxins from gorgonian-derived fungus *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076," *Tetrahedron*, vol. 69, no. 9, pp. 2113–2117, 2013.
- [239] N. I. Kalinovskaya, L. A. Romanenko, and A. I. Kalinovskiy, "Antibacterial low-

- molecular-weight compounds produced by the marine bacterium *Rheinheimera japonica* KMM 9513T," *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, vol. 110, no. 5, pp. 719–726, 2017.
- [240] G. Degrassi, C. Aguilar, M. Bosco, S. Zahariev, S. Pongor, and V. Venturi, "Plant Growth-Promoting *Pseudomonas putida* WCS358 Produces and Secretes Four Cyclic Dipeptides : Cross-Talk with Quorum Sensing Bacterial Sensors," vol. 45, pp. 250–254, 2002.
- [241] K.-H. Rhee, "Isolation and characterization of *Streptomyces* sp KH-614 producing anti-VRE (vancomycin-resistant enterococci) antibiotics," *J. Gen. Appl. Microbiol.*, vol. 48, no. 6, pp. 321–7, 2002.
- [242] P. S. Yan, Y. Song, E. Sakuno, H. Nakajima, H. Nakagawa, and K. Yabe, "Cyclo(L-leucyl-L-prolyl) produced by *Achromobacter xylosoxidans* inhibits aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, no. 12, pp. 7466–7473, 2004.
- [243] F. Dal Bello *et al.*, "Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7," *J. Cereal Sci.*, vol. 45, no. 3, pp. 309–318, 2007.
- [244] S. Nishanth Kumar, C. Mohandas, and B. Nambisan, "Purification of an antifungal compound, cyclo(L-Pro-D-Leu) for cereals produced by *Bacillus cereus* subsp. thuringiensis associated with entomopathogenic nematode," *Microbiol. Res.*, vol. 168, no. 5, pp. 278–288, 2013.
- [245] N. Kumar and C. M. Bala, "Isolation of proline-based cyclic dipeptides from *Bacillus* sp. N strain associated with rhabditid entomopathogenic nematode and its antimicrobial properties," pp. 355–364, 2013.
- [246] P. Wattana-Amorn, W. Charoenwongsa, C. Williams, M. P. Crump, and B. Apichaisataienchote, "Antibacterial activity of cyclo(L-Pro-L-Tyr) and cyclo(D-Pro-L-Tyr) from *Streptomyces* sp. strain 22-4 against phytopathogenic bacteria," *Nat. Prod. Res.*, vol. 30, no. 17, pp. 1980–1983, 2016.
- [247] D. Rajiv and G. Hemendra, "Synthesis and Pharmacological Studies on a

- Cyclooligopeptide from Marine Bacteria," vol. 29, no. 19, pp. 1911–1916, 2011.
- [248] A. Napolitano *et al.*, "Synthesis, structural aspects and cytotoxicity of the natural cyclopeptides yunnanins A, C and phakellistatins 1, 10," *Tetrahedron*, vol. 59, no. 51, pp. 10203–10211, 2003.
- [249] M. Tsuda, H. Shigemori, Y. Mikami, and J. Kobayashi, "Hymenamides C ~ E, new cyclic heptapeptides with two proline residues from the okinawan marine sponge *Hymeniacidon* sp.," *Tetrahedron*, vol. 49, no. 31, pp. 6785–6796, 1993.
- [250] R. Dahiya, D. Pathak, M. Himaja, and S. Bhatt, "First total synthesis and biological screening of hymenamides E.," *Acta Pharm.*, vol. 56, no. 4, pp. 399–415, Dec. 2006.
- [251] J. L. Fox, "Candicidin, a new antifungal antibiotic: first clinical report.," *Antibiot. Med. Clin. Ther. (New York, NY)*, vol. 1, no. 6, pp. 349–50, Jun. 1955.
- [252] N. Kumar, J. N. Gorantla, C. Mohandas, B. Nambisan, and R. S. Lankalapalli, "Isolation and antifungal properties of *cyclo*(D -Tyr-L-Leu) diketopiperazine isolated from *Bacillus* sp. associated with rhabditid entomopathogenic nematode," *Nat. Prod. Res.*, vol. 27, no. 23, pp. 2168–2172, 2013.
- [253] D. Vázquez-Rivera *et al.*, "Cytotoxicity of cyclodipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 leads to apoptosis in human cancer cell lines," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, 2015.
- [254] H. D. Ardila and B. L. Higuera, "Inducción diferencial de polifenoloxidasas y β -1, 3-glucanasa en clavel (*Dianthus caryophyllus*) durante la infección por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* raza 2.," *Acta Biol. Colomb.*, vol. 10, no. 2, pp. 61–74, 2005.
- [255] N. Imamura, K. Adachi, and M. Nishijima, "isolation, physico-chemical properties and structure determination of urauchimycins A and B. Taxonomy of the Producing Strain Ni-80 Cultural and Physiological Characteristics The International Streptomyces Project (ISP) media recommended by Shirling a," *Growth (Lakeland)*, vol. 46, no. 2.
- [256] K. Hayashi and H. Nozaki, "Kitamycins, new antimycin antibiotics produced by *Streptomyces* sp.," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 52, no. 3, pp. 325–8, 1999.

- [257] C. B. F. Yao, M. Schiebel, E. Helmke, H. Anke, and H. Laatsch, "Prefluostatin and new urauchimycin derivatives produced by Streptomycete isolates," *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. B J. Chem. Sci.*, vol. 61, no. 3, pp. 320–325, 2006.
- [258] J. Liu, X. Zhu, S. J. Kim, and W. Zhang, "Antimycin-type depsipeptides: discovery, biosynthesis, chemical synthesis, and bioactivities," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 33, no. 10, pp. 1146–1165, 2016.
- [259] W. K. Strangman, H. C. Kwon, D. Broide, P. R. Jensen, and W. Fenical, "Potent inhibitors of pro-inflammatory cytokine production produced by a marine-derived bacterium," *J. Med. Chem.*, vol. 52, no. 8, pp. 2317–27, Apr. 2009.
- [260] L. Y. Xu *et al.*, "Antimycins A19 and A20, two new antimycins produced by marine actinomycete *Streptomyces antibioticus* H74-18," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 64, no. 10, pp. 661–665, 2011.
- [261] D. B. and D. K. G. Schilling, "Antimycin A components. II. Identification and analysis of antimycin A fractions by pyrolysis-gas liquid chromatography," *J. Antibiot.*, vol. 23, pp. 75–80, 1970.
- [262] N. Hosotani, K. Kumagai, H. Nakagawa, T. Shimatani, and I. Saji, "Antimycins A10 approximately A16, seven new antimycin antibiotics produced by *Streptomyces* spp. SPA-10191 and SPA-8893," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 58, no. 7, pp. 460–467, 2005.
- [263] K. Shiomi *et al.*, "A New Antibiotic, Antimycin A9, Produced by *Streptomyces* sp. K01-0031," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 58, no. 1, pp. 74–78, Jan. 2005.
- [264] George R. Pettit *et al.*, "Antineoplastic Agents. 560. Isolation and Structure of Kitastatin 1 from an Alaskan *Kitasatospora* sp.1," pp. 1069–1072, 2007.
- [265] S.-P. Tzung *et al.*, "Antimycin A mimics a cell-death-inducing Bcl-2 homology domain 3," *Nat. Cell Biol.*, vol. 3, no. 2, pp. 183–191, Feb. 2001.
- [266] H. H. Wasserman and R. J. Gambale, "Synthesis of (+)-antimycin A3. Use of the oxazole ring in protecting and activating functions," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 107, no. 5, pp. 1423–1424, Mar. 1985.

- [267] S. L. Abidi and B. R. Adams, "¹H and ¹³C Resonance Designation of Antimycin A , by Two-Dimensional NMR Spectroscopy," vol. 25, no. June, pp. 1078–1080, 1987.
- [268] C. J. Barrow *et al.*, "Antimycins, inhibitors of ATP-citrate lyase, from a *Streptomyces* sp.," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 50, no. 9, pp. 729–733, 1997.
- [269] M. Ben Amar *et al.*, "The new *Streptomyces* sp. TN605 Strain Secretes Simultaneously three active compounds and a High Level of the Interesting Pharmaceutical Industry Intermediate: 2-Hydroxyphenylacetic Acid," *Bull. Environ. Pharmacol. Life Sci.* , vol. 1, no. 5, pp. 48–56, 2012.
- [270] K. Purves *et al.*, "Using molecular networking for microbial secondary metabolite bioprospecting," *Metabolites*, vol. 6, no. 1, 2016.
- [271] M. J. Bibb, "Regulation of secondary metabolism in streptomycetes," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 8, no. 2, pp. 208–215, 2005.
- [272] G. P. van Wezel and K. J. McDowall, "The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 28, no. 7, p. 1311, Jul. 2011.
- [273] P. Yagüe, M. T. Lopez-Garcia, B. Rioseras, J. Sanchez, and A. Manteca, "New insights on the development of *Streptomyces* and their relationships with secondary metabolite production.," *Curr. trends Microbiol.*, vol. 8, pp. 65–73, 2012.
- [274] V. Yoon and J. R. Nodwell, "Activating secondary metabolism with stress and chemicals," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 41, no. 2, pp. 415–424, 2014.
- [275] J. Schripsema, "Application of NMR in plant metabolomics: Techniques, problems and prospects," *Phytochem. Anal.*, vol. 21, no. 1, pp. 14–21, 2010.
- [276] X. Li and K. Hu, "Quantitative NMR Studies of Multiple Compound Mixtures," in *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, vol. 90, 2017, pp. 85–143.
- [277] A. S. Marchev, I. Y. Aneva, I. K. Koycheva, and M. I. Georgiev, "Phytochemical variations of *Rhodiola rosea* L. wild-grown in Bulgaria," *Phytochem. Lett.*, Dec. 2016.

- [278] H. Tian, S. Lam, and G. Shui, "Metabolomics, a Powerful Tool for Agricultural Research," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 11, p. 1871, 2016.
- [279] Y. Hikichi, H. Egami, Y. Oguri, and T. Okuno, "Fitness for Survival of *Burkholderia glumae* Resistant to Oxolinic Acid in Rice Plants.," *Japanese J. Phytopathol.*, vol. 64, no. 3, pp. 147–152, Jun. 1998.
- [280] V. O. Stockwell and B. Duffy, "Use of antibiotics in plant agriculture," *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, vol. 31, no. 1, pp. 199–210, 2012.
- [281] J. Turło, W. Gajzlerska, M. Klimaszewska, M. Król, M. Dawidowski, and B. Gutkowska, "Enhancement of tacrolimus productivity in *Streptomyces tsukubaensis* by the use of novel precursors for biosynthesis," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 51, no. 6–7, pp. 388–395, 2012.
- [282] A. C. Dona *et al.*, "Precision High-Throughput Proton NMR Spectroscopy of Human Urine, Serum, and Plasma for Large-Scale Metabolic Phenotyping," *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 19, pp. 9887–9894, Oct. 2014.
- [283] C. Heude, J. Nath, J. B. Carrigan, and C. Ludwig, "Nuclear Magnetic Resonance Strategies for Metabolic Analysis," 2017, pp. 45–76.
- [284] R. T. McKay, "How the 1D-NOESY suppresses solvent signal in metabonomics NMR spectroscopy: An examination of the pulse sequence components and evolution," *Concepts Magn. Reson. Part A Bridg. Educ. Res.*, vol. 38 A, no. 5, pp. 197–220, 2011.
- [285] G. Zheng and W. S. Price, "Solvent signal suppression in NMR," *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, vol. 56, no. 3, pp. 267–288, Apr. 2010.
- [286] S. Paik *et al.*, "Unusual cytotoxic phenethylamides from *Xenorhabdus nematophilus*," *Bull. Korean Chem. Soc.*, vol. 22, no. 4, pp. 372–374, 2001.
- [287] L. H. Yang, L. Miao, O. O. Lee, and X. Li, "Effect of culture conditions on antifouling compound production of a sponge-associated fungus," pp. 1221–1231, 2007.
- [288] M. E. Teasdale, J. Liu, J. Wallace, F. Akhlaghi, and D. C. Rowley, "Secondary metabolites produced by the marine bacterium *Halobacillus salinus* that Inhibit quorum sensing-

- controlled phenotypes in gram-negative bacteria," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, no. 3, pp. 567–572, 2009.
- [289] M. E. Teasdale, K. A. Donovan, S. R. Forschner-Dancause, and D. C. Rowley, "Gram-Positive Marine Bacteria as a Potential Resource for the Discovery of Quorum Sensing Inhibitors," *Mar. Biotechnol.*, vol. 13, no. 4, pp. 722–732, Aug. 2011.
- [290] S. Kumar, V. Costantino, V. Venturi, and L. Steindler, "Quorum sensing inhibitors from the sea discovered using bacterial N-acyl-homoserine lactone-based biosensors," *Mar. Drugs*, vol. 15, no. 3, 2017.
- [291] J. G. V. Alonso-herranz, C. Barbas, and E. Grace, "Controlling the quality of metabolomics data : new strategies to get the best out of the QC sample," *Metabolomics*, pp. 518–528, 2015.
- [292] H. K. Kim, Y. H. Choi, and R. Verpoorte, "NMR-based plant metabolomics: Where do we stand, where do we go?," *Trends Biotechnol.*, vol. 29, no. 6, pp. 267–275, 2011.

Anexo 1: Descripción morfológica de los 24 aislados en 4 medios de cultivo

Aislamiento	Agar nutritivo	ISP-2	ISP-3	ISP-4
PNM-3	1. Morfología de las colonias: irregulares, opacas, de bordes no definidos 2. Pigmentación Anverso: Amarillo Reverso: No 3. Se observa esporulación escasa, blanca No se observa producción de metabolitos secundarios	1. Morfología de las colonias: filamentosas, opacas sin bordes definidos 2. Pigmentación Anverso: Crema Reverso: No 3. Se observa esporulación moderada, blanca No se observa producción de metabolitos secundarios	1. Morfología de las colonias: redondas de bordes definidos, pulverulentas 2. Pigmentación Anverso: Amarillo Reverso: Café 3. Se observa esporulación, blanca 4. No se observa producción de metabolitos secundarios	1. Morfología de las colonias: redondas, de bordes definidos, pulverulentas 2. Pigmentación Anverso: Crema Reverso: Café 3. Se observa esporulación, blanca No se observa producción de metabolitos secundarios
PNM-5	1. Morfología de las colonias: pequeñas, redondas, de bordes definidos, opacas 2. Pigmentación Anverso: Crema Reverso: No 3. Se observa esporulación, blanca grisácea 4. No se observa producción de metabolitos	1. Morfología de las colonias: convexas de bordes definidos 2. Pigmentación Anverso: Crema Reverso: No 3. Se observa esporulación, blanca 4. Se observa producción de metabolitos	1. Morfología de las colonias: redondas de bordes definidos, pulverulentas 2. Pigmentación Anverso: Blanca Reverso: No 3. Se observa esporulación, blanca No se observa producción de metabolitos	1. Morfología de las colonias: redondas, concéntricas, de bordes definidos 2. Pigmentación Anverso: Crema Reverso: No 3. Se observa esporulación, Gris-crema 4. No se observa producción de metabolitos

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

PNM-6	<p>1. Morfología de las colonias: Pulverulentas, de bordes no definidos</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Crema Reverso: No</p> <p>3. Se observa esporulación blanca</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: filamentosas, redondas, sin bordes definidos</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Amarillo Reverso: No</p> <p>3. Se observa esporulación escasa, blanca</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: Pequeñas, redondas, opacas</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Amarillo Reverso: Café</p> <p>3. Se observa esporulación escasa, amarilla-crema</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: redondas, de bordes definidos, opacas</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Amarillo Reverso: No</p> <p>3. Se observa esporulación, blanca</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>
PNM-9	<p>1. Morfología de las colonias: redondas, opacas, de bordes definidos</p> <p>2. Pigmentación Anverso: crema Reverso: Café claro</p> <p>3. No se observa esporulación</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: pequeñas, redondas, opacas, puntiformes, de bordes definidos</p> <p>2. Pigmentación Anverso: crema Reverso: naranja</p> <p>3. No se observa esporulación</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: pequeñas y opacas,</p> <p>2. Pigmentación Anverso: crema Reverso: naranja</p> <p>3. No se observa esporulación</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: redondas, opacas, de bordes definidos</p> <p>2. Pigmentación Anverso: crema Reverso: Café claro</p> <p>3. No se observa esporulación</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>

PNM-13	<p>1. Morfología de las colonias: irregulares, sin bordes definidos, opacas</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Crema Reverso: No</p> <p>3. Se observa esporulación, blanca</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: filamentosas, redondas, de bordes definidos</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Amarillo Reverso: No</p> <p>3. Se observa esporulación, blanca</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: Pequeñas, redondas, opacas</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Amarillo claro Reverso: Café claro</p> <p>3. Se observa esporulación blanca</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: redondas, de bordes definidos</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Crema Reverso: No</p> <p>3. Se observa esporulación, Crema</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>
PNM-25	<p>1. Morfología de las colonias: pequeñas, redondas, cóncavas, opacas, de bordes definidos</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Naranja Reverso: No</p> <p>3. No se observa esporulación</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: redondas, opacas, cóncavas, de bordes definidos</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Salmón Reverso: No</p> <p>3. No se observa esporulación</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: pequeñas, redondas y opacas</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Rosadas Reverso: No</p> <p>3. No se observa esporulación</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: pequeñas, redondas y opacas. Escaso crecimiento en este medio</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Rosadas Reverso: No</p> <p>3. No se observa esporulación</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>

<p align="center">PNM-46b</p>	<p>1. Morfología de las colonias: pequeñas, redondas, opacas, de bordes definidos, filamentosas</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Crema Reverso: No</p> <p>3. No se observa esporulación</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: pequeñas, redondas, de bordes definidos, convexas y pulverulentas</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Amarillo claro Reverso: Naranja claro</p> <p>3. Se observa esporulación, crema</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: pequeñas, redondas, de bordes definidos</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Crema Reverso: No</p> <p>3. Se observa esporulación, blanca</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: pequeñas, redondas, de bordes definidos, pulverulentas, convexas</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Crema Reverso: No</p> <p>3. Se observa esporulación, Amarilla clara</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>
<p align="center">PNM-87</p>	<p>1. Morfología de las colonias: opacas, de sin bordes definidos</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Amarillo Reverso: No</p> <p>3. Se observa esporulación escasa, blanca</p>	<p>1. Morfología de las colonias: redondas, debordes definidos, convexas</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Crema Reverso: No</p>	<p>1. Morfología de las colonias: redondas, de bordes definidos, pulverulentas</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Crema Reverso: Naranja</p>	<p>1. Morfología de las colonias: de bordes definidos, concéntricas y convexas</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Crema Reverso: No</p>

	4. No se observa producción de metabolitos	3. Se observa esporulación, blanca 4. No se observa producción de metabolitos	3. Se observa esporulación, blanca-amarilla 4. No se observa producción de metabolitos	3. Se observa esporulación blanca 4. No se observa producción de metabolitos
PNM-89.3	1. Morfología de las colonias: Redondas, sin bordes definidos, opacas 2. Pigmentación Anverso: Crema Reverso: No 3. Se observa esporulación, blanca 4. No se observa producción de metabolitos	1. Morfología de las colonias: filamentosas, de bordes definidos, opacas 2. Pigmentación Anverso: Amarilla Reverso: Café claro 3. Se observa esporulación, blanca 4. No se observa producción de metabolitos	1. Morfología de las colonias: redondas, de bordes definidos, opacas 2. Pigmentación Anverso: Amarilla Reverso: Café oscuro 3. Se observa esporulación, blanca 4. No se observa producción de metabolitos	1. Morfología de las colonias: filamentosas, opacas 2. Pigmentación Anverso: Amarillo claro Reverso: No 3. Se observa esporulación, amarilla 4. No se observa producción de metabolitos
PNM-89.4	1. Morfología de las colonias: Redondas, de bordes definidos, opacas 2. Pigmentación	1. Morfología de las colonias: filamentosas, de bordes definidos, opacas 2. Pigmentación Anverso: Amarilla Reverso: No	1. Morfología de las colonias: redondas, de bordes definidos, convexas 2. Pigmentación Anverso: Gris Reverso: Café claro	1. Morfología de las colonias: Redondas, opacas, concéntricas, de bordes definidos 2. Pigmentación

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

	<p>Anverso: Amarillo claro Reverso: No</p> <p>3. No se observa esporulación</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>3. Se observa esporulación escasa, blanca</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>3. Se observa esporulación, crema</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>Anverso: Crema Reverso: No</p> <p>3. Se observa esporulación, blanca</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>
PNM-102 N	<p>1. Morfología de las colonias: Redondas, brillante, mucosa, sin bordes definidos</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Amarillo Reverso: No</p> <p>3. No se observa esporulación</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: Redonda, pequeña, brillante</p> <p>2. Pigmentación Anverso: El color base es amarillo y luego de 5 días de crecimiento se torna negra Reverso: No</p> <p>3. No se observa esporulación</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: Redondas, brillante, mucosa, convexas</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Naranja y con el tiempo se torna negra Reverso: No</p> <p>3. No se observa esporulación</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: Cóncavas, pequeñas, redondas, brillantes, de bordes definidos</p> <p>2. Pigmentación Anverso: El color base es naranja y luego de 5 días de crecimiento se torna negra Reverso: No</p> <p>3. No se observa esporulación</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>

<p>PNM-143</p>	<p>1. Morfología de las colonias: Pulverulentas de bordes irregulares</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Blanca Reverso: No</p> <p>3. No se observa esporulación</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: Pulverulentas de bordes irregulares</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Blanca Reverso: No</p> <p>3. Se observa esporulación, blanca</p> <p>4. Se observa producción de metabolitos secundarios como burbujas sobre la superficie de la colonia</p>	<p>1. Morfología de las colonias: Pulverulentas de bordes irregulares. Menor crecimiento en comparación a los otros medios.</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Blanca Reverso: No</p> <p>3. Se observa esporulación, blanca</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: Pulverulentas de bordes irregulares</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Blanca Reverso: No</p> <p>3. Se observa diferentes tonalidades de pigmentación grisácea asociada a la esporulación en este medio</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>
<p>PNM-144</p>	<p>1. Morfología de las colonias: Redondas, de bordes definidos</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Crema Reverso: No</p>	<p>1. Morfología de las colonias: Medianas, de bordes definidos</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Crema Reverso: No</p>	<p>1. Morfología de las colonias: pequeñas, redondas, pulverulentas. El crecimiento es menor comparado a los otros medios</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Crema Reverso: No</p>	<p>1. Morfología de las colonias: redondas, de bordes irregulares, algodonosas</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Gris-crema Reverso: No</p>

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

	<p>3. Se observa esporulación, blanca</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>3. Se observa esporulación, blanca</p> <p>4. Se observa producción de metabolitos</p>	<p>3. Se observa esporulación, blanca</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>3. Se observa esporulación, gris cremoso</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>
PNM-144 a	<p>1. Morfología de las colonias: irregulares, sin bordes definidos</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Crema Reverso: No</p> <p>3. Se observa esporulación, gris claro</p> <p>4. Se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: irregulares, sin bordes definidos</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Blanca Reverso: No</p> <p>3. Se observa esporulación, gris claro</p> <p>4. Se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: irregulares, sin bordes definidos</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Blanca Reverso: No</p> <p>3. Se observa esporulación, gris claro</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: irregulares, sin bordes definidos</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Blanca Reverso: No</p> <p>3. Se observa esporulación, gris claro</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>
PNM-145	<p>1. Morfología de las colonias: Redondas sin bordes definidos</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Crema Reverso: Café</p>	<p>1. Morfología de las colonias: Redondas sin bordes definidos</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Crema</p>	<p>1. Morfología de las colonias: Redondas sin bordes definidos. Menor crecimiento comparado con los otros medios</p> <p>2. Pigmentación</p>	<p>1. Morfología de las colonias: Irregulares, sin bordes definidos</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Blanca Reverso: No</p>

	<p>3. Se observa esporulación, blanca</p> <p>4. Se observa producción de metabolitos</p>	<p>Reverso: No</p> <p>3. Se observa esporulación, blanca</p> <p>4. Se observa producción de metabolitos secundarios</p>	<p>Anverso: Crema</p> <p>Reverso: No</p> <p>3. Se observa esporulación, blanca</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>3. Se observa esporulación, gris-rosada</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>
PNM-148	<p>1.Morfología de las colonias: redondas, pequeñas, con bordes definidos</p> <p>2. Pigmentación Anverso: crema Reverso: No</p> <p>3. Se observa esporulación, gris</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1.Morfología de las colonias: redondas, pequeñas, pulverulentas</p> <p>2. Pigmentación Anverso: crema Reverso: No</p> <p>3. Se observa esporulación, blanca</p> <p>4. Se observa producción de metabolitos</p>	<p>1.Morfología de las colonias: redondas, pequeñas, pulverulentas</p> <p>2. Pigmentación Anverso: crema Reverso: No</p> <p>3. Se observa esporulación, blanca</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1.Morfología de las colonias: Irregulares, pequeñas, pulverulentas</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Blanca Reverso: No</p> <p>3. Se observa esporulación, Gris-rosado</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>
PNM-149	<p>1.Morfología de las colonias: redondas, con bordes definidos</p> <p>2. Pigmentación Anverso: crema Reverso: No</p>	<p>1.Morfología de las colonias: redondas, con bordes definidos, convexas, pulverulentas</p> <p>2. Pigmentación Anverso: crema Reverso: No</p>	<p>1.Morfología de las colonias: redondas, pulverulentas</p> <p>2. Pigmentación Anverso: crema Reverso: Amarillo claro</p> <p>3. No se observa esporulación, blanca</p>	<p>1.Morfología de las colonias: redondas, algodonosas de bordes definidos</p> <p>2. Pigmentación Anverso: blanca Reverso: No</p> <p>3. No se observa esporulación, blanca</p> <p>4. Se observa metabolitos</p>

Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos

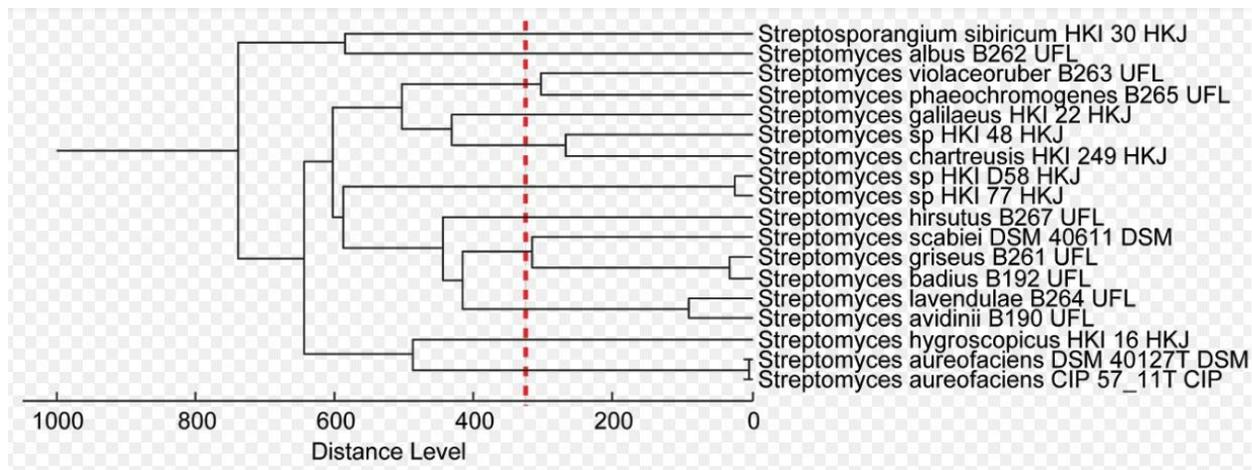
	3. Se observa esporulación, blanca 4. No se observa producción de metabolitos	3. Se observa esporulación, blanca 4. Se observan metabolitos secundarios	4. Se observa producción de metabolitos	
PNM-149 a	1. Morfología de las colonias: brillantes, mucosas, se desprenden del agar 2. Pigmentación Anverso: Amarillo Reverso: Amarillo 3. No se observa esporulación 4. No se observa producción de metabolitos	1 Morfología de las colonias: brillantes, mucosas, de bordes definidos 2. Pigmentación Anverso: Amarillo Reverso: Amarillo 3. No se observa esporulación 4. No se observa producción de metabolitos	1 Morfología de las colonias: pulverulentas Pigmentación Anverso: crema Reverso: café claro 3. Se observa esporulación, blanca 4. No se observa producción de metabolitos	1 Morfología de las colonias: pulverulentas sin bordes definidos 2. Pigmentación Anverso: blanca Reverso: No 3. Se observa esporulación, gris 4. No se observa producción de metabolitos
PNM-161 a	1. Morfología de las colonias: opacas, redondas, de bordes definidos 2. Pigmentación Anverso: Crema Reverso: No 3. Se observa esporulación, blanca 4. No se observa producción de metabolitos	1. Morfología de las colonias: filamentosas, opacas 2. Pigmentación Anverso: Amarillo Reverso: Naranja 3. No se observa esporulación 4. No se observa producción de metabolitos	1. Morfología de las colonias: Redondas, pequeñas, convexas, opacas 2. Pigmentación Anverso: Amarillo pálido Reverso: café 3. No se observa esporulación 4. No se observa producción de metabolitos	1. Morfología de las colonias: redondas, pulverulentas, de bordes definidos, cóncavas 2. Pigmentación Anverso: Amarillo pálido Reverso: No 3. Se observa esporulación, escasa, blanca 4. No se observa producción de metabolitos

<p>PNM-161 b</p>	<p>1. Morfología de las colonias: pequeñas, opacas, redondas, de bordes definidos 2. Pigmentación Anverso: Amarilla Reverso: No 3. Se observa esporulación escasa, blanca 4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: redondas, filamentosas, opacas, de bordes definidos 2. Pigmentación Anverso: Amarillo Reverso: Amarillo verdoso 3. Se observa esporulación blanca 4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: Redondas, pequeñas, convexas, opacas 2. Pigmentación Anverso: Amarillo pálido Reverso: café 3. Se observa esporulación muy escasa, blanca 4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: muy irregulares, sin bordes definidos, opacas 2. Pigmentación Anverso: Crema Reverso: No 3. Se observa esporulación, amarillo -crema 4. No se observa producción de metabolitos</p>
<p>PNM-182</p>	<p>1. Morfología de las colonias: redondas, pequeñas, opacas, de bordes definidos, convexas 2. Pigmentación Anverso: las colonias inicialmente son rojas Reverso: Amarillo 3. No se observa esporulación 4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: redondas, opacas, filamentosas, de bordes definidos, convexas 2. Pigmentación Anverso: las colonias inicialmente son crema y posterior a la incubación se tornan rojas Reverso: roja 3. Se observa esporulación rosado pálido, algodonosa 4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: redondas, opacas, filamentosas, de bordes definidos, convexas 2. Pigmentación Anverso: las colonias inicialmente son crema y posterior a la incubación se tornan rojas Reverso: No 3. Se observa esporulación rosado pálido, algodonosa 4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: redondas, opacas, filamentosas, de bordes definidos, convexas 2. Pigmentación Anverso: las colonias inicialmente son crema y posterior a la incubación se tornan rojas Reverso: No 3. Se observa esporulación rosado pálido, algodonosa 4. No se observa producción de metabolitos</p>

PNM-184	<p>1. Morfología de las colonias: redondas, opacas, de bordes definidos</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Amarillo claro</p> <p>Reverso: No</p> <p>3. Se observa esporulación, blanca</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: redondas, de bordes definidos, filamentosas</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Amarillo claro</p> <p>Reverso: Naranja claro</p> <p>3. Se observa esporulación, blanca</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: redondas, pequeñas, de bordes definidos</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Crema</p> <p>Reverso: Naranja claro</p> <p>3. Se observa esporulación, blanca</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: redondas, pequeñas, opacas, de bordes definidos</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Crema</p> <p>Reverso: No</p> <p>3. Se observa esporulación, blanca-grisacea</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>
PNM-194	<p>1. Morfología de las colonias: redondas, pequeñas, sin bordes definidos, opacas</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Crema</p> <p>Reverso: No</p> <p>3. Se observa esporulación escasa, blanca</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: redondas, filamentosas, de bordes definidos</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Crema</p> <p>Reverso: No</p> <p>3. Se observa esporulación, blanca</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: redondas, pequeñas, de bordes definidos, opacas</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Crema</p> <p>Reverso: Café claro</p> <p>3. Se observa esporulación, blanca</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>	<p>1. Morfología de las colonias: redondas, de bordes definidos, pulverulentas</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Crema</p> <p>Reverso: No</p> <p>3. Se observa esporulación, crema</p> <p>4. No se observa producción de metabolitos</p>
PNM-208	<p>1. Morfología de las colonias: Pequeñas, opacas de bordes definidos</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Crema</p>	<p>1. Morfología de las colonias: Irregulares, filamentosas, opacas</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Amarillo claro</p> <p>Reverso: No</p>	<p>1. Morfología de las colonias: redondas, de bordes definidos, pulverulentas</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Blanca</p> <p>Reverso: Café-verdoso</p>	<p>1. Morfología de las colonias: Irregulares, sin bordes definidos, opacas</p> <p>2. Pigmentación Anverso: Crema</p> <p>Reverso: No</p>

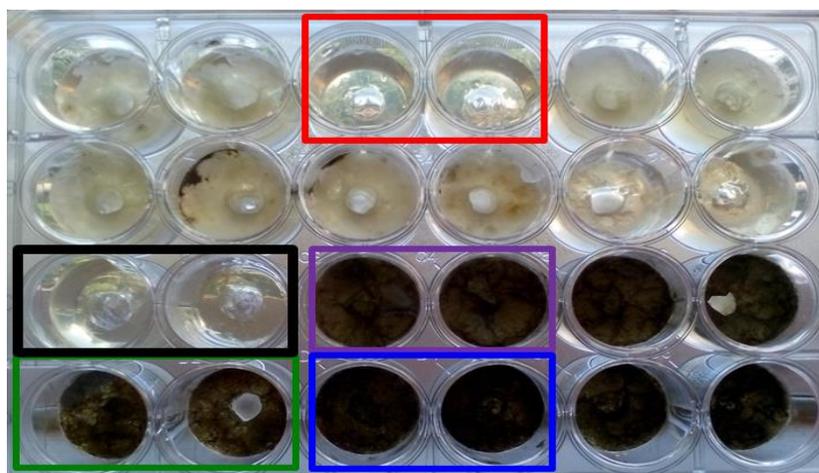
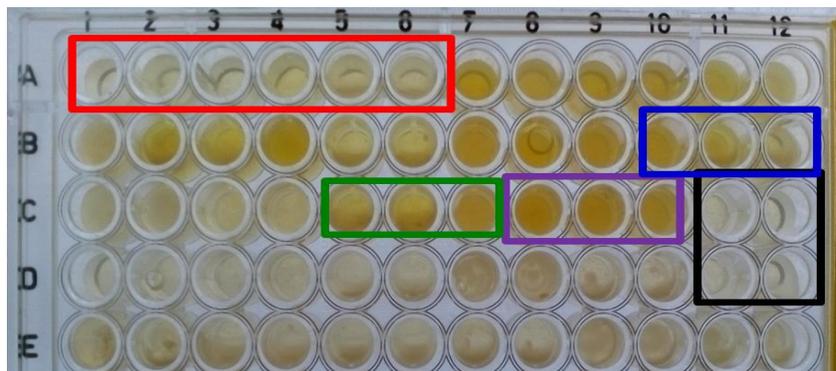
	Reverso: No 3. Se observa esporulación, blanca 4. No se observa producción de metabolitos	3. Se observa esporulación escasa, blanca 4. No se observa producción de metabolitos	3. Se observa esporulación amarilla claro 4. No se observa producción de metabolitos	3. Se observa esporulación amarilla crema 4. No se observa producción de metabolitos
--	---	---	---	---

Anexo 2: Los espectros disponibles en la base de datos del MALDI-TOF se utilizaron para calcular el limite de referencia estimado de las especies de actinobacterias. El limite calculado entre especies similares fue definido por un 70% de similitud.

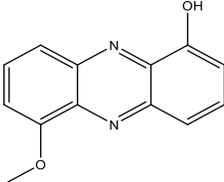
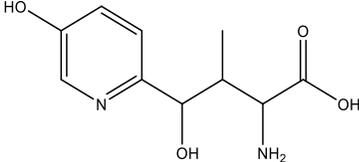
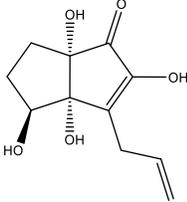


Anexo 3 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos y

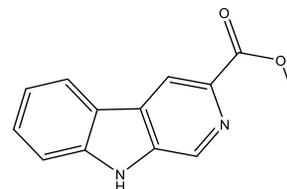
acuosos de las cepas de actinobacterias: En la parte superior se observa una fotografía del ensayo contra *Burkholderia* sp. en placa de 96 pozos. En el recuadro verde se observa el control negativo, en negro el control positivo (Gentamicina), en azul el control del medio de cultivo (TSB), en morado el control del solvente DMSO 5% y AcOEt y en rojo un resultado positivo de la actividad antibacteriana de uno de los extractos. En la parte inferior se observa el ensayo de actividad antifúngica contra *Colletotrichum gloeosporioides* en placa de 24 pozos. En el recuadro verde se observa el control negativo (2 mL PDA + tapete de conidias); en negro el control positivo (Clotrimazol al 1%), en azul el control de medio de cultivo (TSB); en morado el control del y en rojo un resultado positivo de la actividad antifúngica de uno de los extractos.



Anexo 4. Tabla de dereplicación de las variables identificadas en el perfilado metabólico.

ID	<i>m/z</i>	Rt	Fórmula molecular	Peso molecular	Hits (Número de hits en la base de datos Antimarin)
7149	227.2	15.5	C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O ₂	226.235	1-Hidroxi-6-metoxi-fenazina Fuente: <i>Streptomyces thioluteus</i> 
			C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₄	226.232	Nikkomicina D Fuente: <i>Streptomyces tendae</i> Tue 901 
			C ₁₁ H ₁₄ O ₅	226.228	Xialenona C Fuente: <i>Streptomyces</i> sp. GT 061169 
			C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O ₂	226.235	beta-Carboline-3-carboxylic acid methyl ester

Fuente: *Streptomyces* sp.
Ma5373



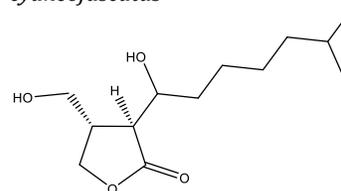
6869 245.1 35.2

No hits

7181 245.3 43.7 C₁₃H₂₄O₄ 244.331

Graefe's Factor I

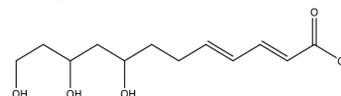
Fuente: *Streptomyces*
viridochromogenes, *S.*
cyaneofuscatus



C₁₂H₂₀O₅ 244.287

YF-0200-R-B

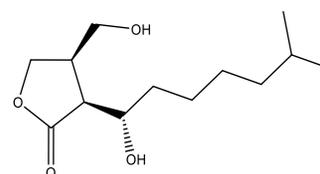
Fuente: *Streptomyces* sp.
YF-0200R



C₁₃H₂₄O₄ 244.331

Graefe's Factor 2

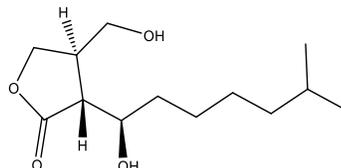
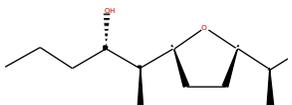
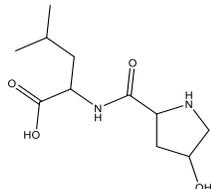
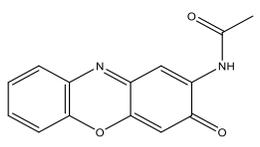
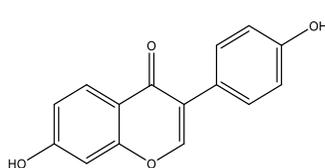
Fuente: *Streptomyces* sp.

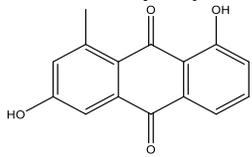
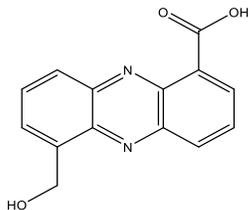
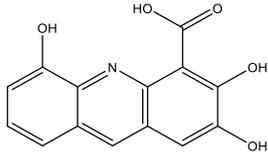
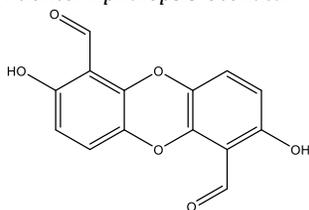


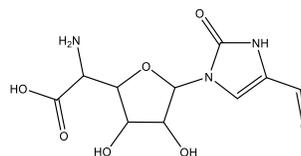
C₁₃H₂₄O₄ 244.331

SCB-1

Fuente: *Streptomyces*
coelicolor

					
			$C_{13}H_{24}O_4$	244.331	
					
					Acido trihomonactico
					Fuente: <i>Streptomyces globisporus</i>
			$C_{11}H_{20}N_2O_4$	244.291	Leucil-4-hidroxirolina
					Fuente : <i>Streptomyces acrimycini</i>
					
7416	255.1	37.7			No hits
7712	255.2	19.5	$C_{14}H_{10}N_2O_3$	254.245	N-Acetilquestiomicina A;
					Fuente: <i>Streptomyces thioluteus</i> , <i>Microbispora aerate</i>
					
			$C_{15}H_{10}O_4$	254.241	Isoaurostatina; K-251b
					Fuente: GW82/2497
					

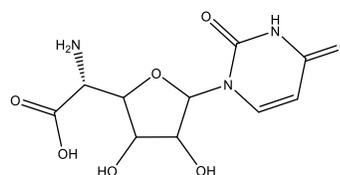
			$C_{15}H_{10}O_4$	254.241	Aloesaponarina II	
					Fuente: <i>Streptomyces</i> sp.	
						
			$C_{14}H_{10}N_2O_3$	254.245	6-Carboxi-1-hidroximetil-fenazina	
					Fuente: <i>Streptomyces griseoluteus</i> ; marine <i>Vibrio</i> sp. SANK 73794	
						
7469	273.2	7.33	$C_{13}H_8N_2O_5$	272.216	Acido 2,3,9-trihidroxifenazina	
					Fuente: <i>Pseudomonas fluorescens</i>	
						
			$C_{14}H_8O_6$	272.212	Aplidioxina B	
					Fuente: <i>Aplidiopsis ocellata</i>	
						
6923	288.2	39.2	$C_{10}H_{13}N_3O_7$	287.228	Nikkomicina Cx	
					Fuente: <i>Streptomyces tendae</i> Tue 901 (ATCC 31160, Cbs 354.75, FERM-p 3136)	



$C_{10}H_{13}N_3O_7$ 287.228

Nikkomicina C;
Nikkomicina Cz

Fuente: *Streptomyces tendae* Tue 901 (ATCC 31160, Cbs 354.75, FERM-p 3136)



7354 300.1 37.5

No hits

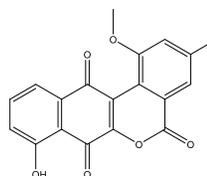
7412 337.1 6.4

No hits

7223 337.3 42.2 $C_{19}H_{12}O_6$ 336.299

WS 5995-A

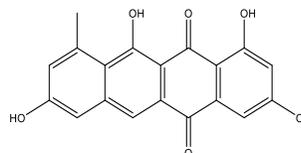
Fuente: *Streptomyces auranticolor* 5995 (FERM-p 5365)



$C_{19}H_{12}O_6$ 336.299

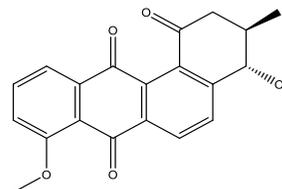
Tetracenomicina D1

Fuente: *Streptomyces glaucescens* Tue 49 (eth 22794)



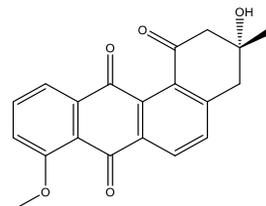
C₂₀H₁₆O₅ 336.343 Rubiginona A2; SNA-8073-A

Fuente: *Streptomyces* sp.



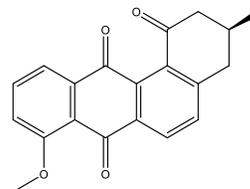
C₂₀H₁₆O₅ 336.343 MM 47755; 8-O-metiltetrangomicina

Fuente: *Streptomyces* sp. GW11/3289



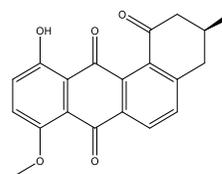
C₂₀H₁₆O₅ 336.343 Hatomarubigina-A; CE-33-A

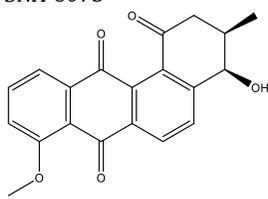
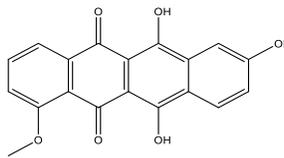
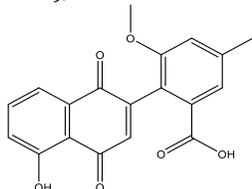
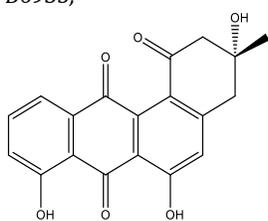
Fuente: *Streptomyces* sp. 2238-svt4 (FERM bp-3326)



C₂₀H₁₆O₅ 336.343 Hatomarubigina-B; CE-33-B

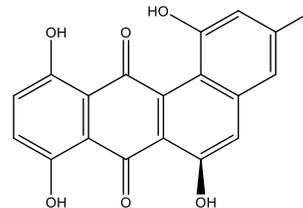
Fuente: *Streptomyces* sp. 2238-svt4



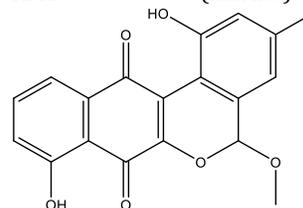
			$C_{20}H_{16}O_5$	336.343	SNA-8073-B	<p>Fuente: <i>Streptomyces</i> sp. SNA-8073</p> 
			$C_{19}H_{12}O_6$	336.299	6,9,11-Trihidroxi-4-metoxi-5,12-naftacenodione	<p>Fuente: <i>Streptomyces</i> sp. GW37/3236</p> 
7618	339.3	15.7	$C_{19}H_{14}O_6$	338.315	WS 5995B	<p>Fuente: <i>Streptomyces auranticolor</i> 5995 (FERM-p 5365),</p> 
			$C_{19}H_{14}O_6$	338.315	Fridamicina C	<p>Fuente: <i>S. tsusimaensis</i>, <i>S. olivaceus</i></p> <p><i>Streptomyces</i> spp. B 6921, B6935,</p> 

C₁₉H₁₄O₆ 338.315

Landomycinone A

Fuente: *Streptomyces* spC₁₉H₁₄O₆ 338.315

Lagumycin A

Fuente: *Streptomyces* sp. B
8245 (marino)

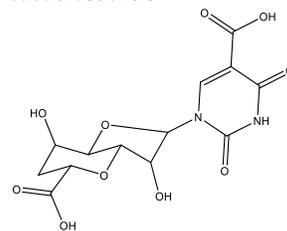
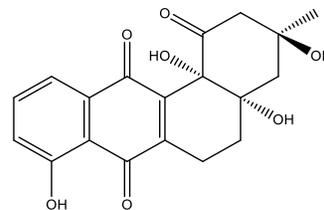
7124

359.3

32.2

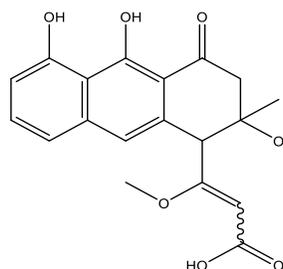
C₁₃H₁₄N₂O₁₀ 358.259

Acido octosil A

Fuente: *Streptomyces*
cacaoiasoensisC₁₉H₁₈O₇ 358.3462-Deoxy-5,6-dihydro-PD-
116198Fuente: *Streptomyces*
phaeochromogenes WP
3688

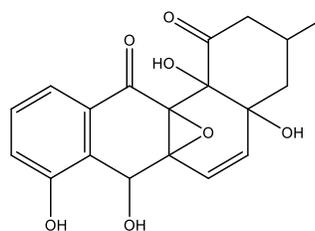
C₁₉H₁₈O₇ 358.346 Spectomycin-A2

Fuente: *Streptomyces spectabilis*



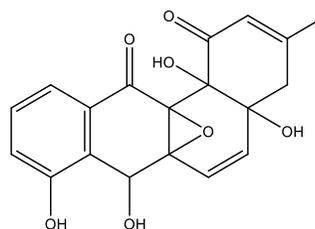
C₁₉H₁₈O₇ 358.346 Elmycin-C

Fuente: *Streptomyces* sp.



C₁₉H₁₈O₇ 358.346 Simocyclinon A1

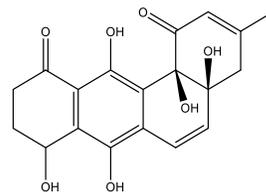
Fuente: *Streptomyces* sp.
Tue 6040



C₁₉H₁₈O₇ 358.346 4,4a,8,9,10,12b-Hexahydro-4a,7,8,12,1

13a,-pentahydroxy--3-methylbenz[a]anthracene-1,11-dione

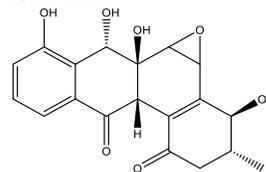
Fuente: *Streptomyces* sp.
1B1



C₁₉H₁₈O₇ 358.346

Panglimycin D

Fuente: *Streptomyces* sp.
ICBB8230

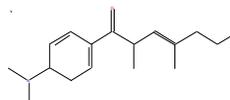


7421	381.0	36.4	No hits
7365	383.0	37.4	No hits
7262	392.1	37.0	No hits
7321	395.1	37.2	No hits
7227	423.1	35.3	No hits
7191	425.0	40.5	No hits
7711	453.0	15.7	No hits
7171	455.0	31.2	No hits
7569	457.2	9.3	No hits
7389	464.0	37.2	No hits
7297	475.0	11.9	No hits
7219	482.3	5.6	No hits
7314	484.0	37.5	No hits
7214	494.1	31.7	No hits
7360	495.1	37.0	No hits

7663	500.1	36.8			No hits
7020	505.0	35.0			No hits
7306	516.1	39.5			No hits
7375	526.1	36.5			No hits
7315	563.3	8.4			No hits
7645	639.1	40.5			No hits
7133	684.7	43.4			No hits
7239	714.3	40.0			No hits
6915	775.3	44.4			No hits

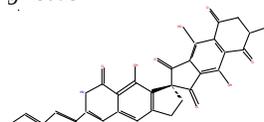
5307	262.4	30.7	$C_{16}H_{23}NO_2$	261.365	Trichostatinol
------	-------	------	--------------------	---------	----------------

Fuente: *Streptomyces* sp. GW37/655



6266	540.5	9.2	$C_{30}H_{21}NO_9$	539.496	Fredericamycin-A; FCRC-A-48; FCRC-A-48-A; NSC-305263
------	-------	-----	--------------------	---------	--

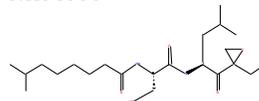
Fuente: *Streptomyces griseus*



4314	415.1	37.1	$C_{21}H_{38}N_2O_6$	414.543	NK-04000Q; Epopromycin B
------	-------	------	----------------------	---------	--------------------------

NK-04000Q; Epopromycin B

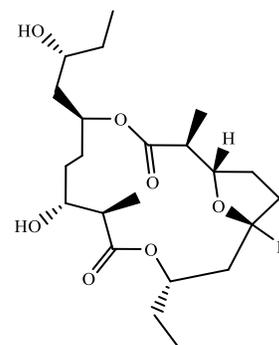
Fuente: *Streptomyces* sp.
NK04000



C₂₂H₃₈O₇ 414.539

Feigrisolide D

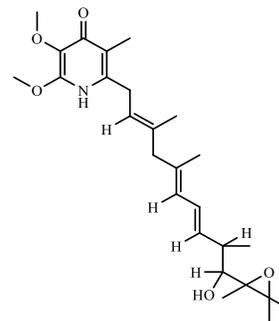
Fuente: *Streptomyces*
griseus



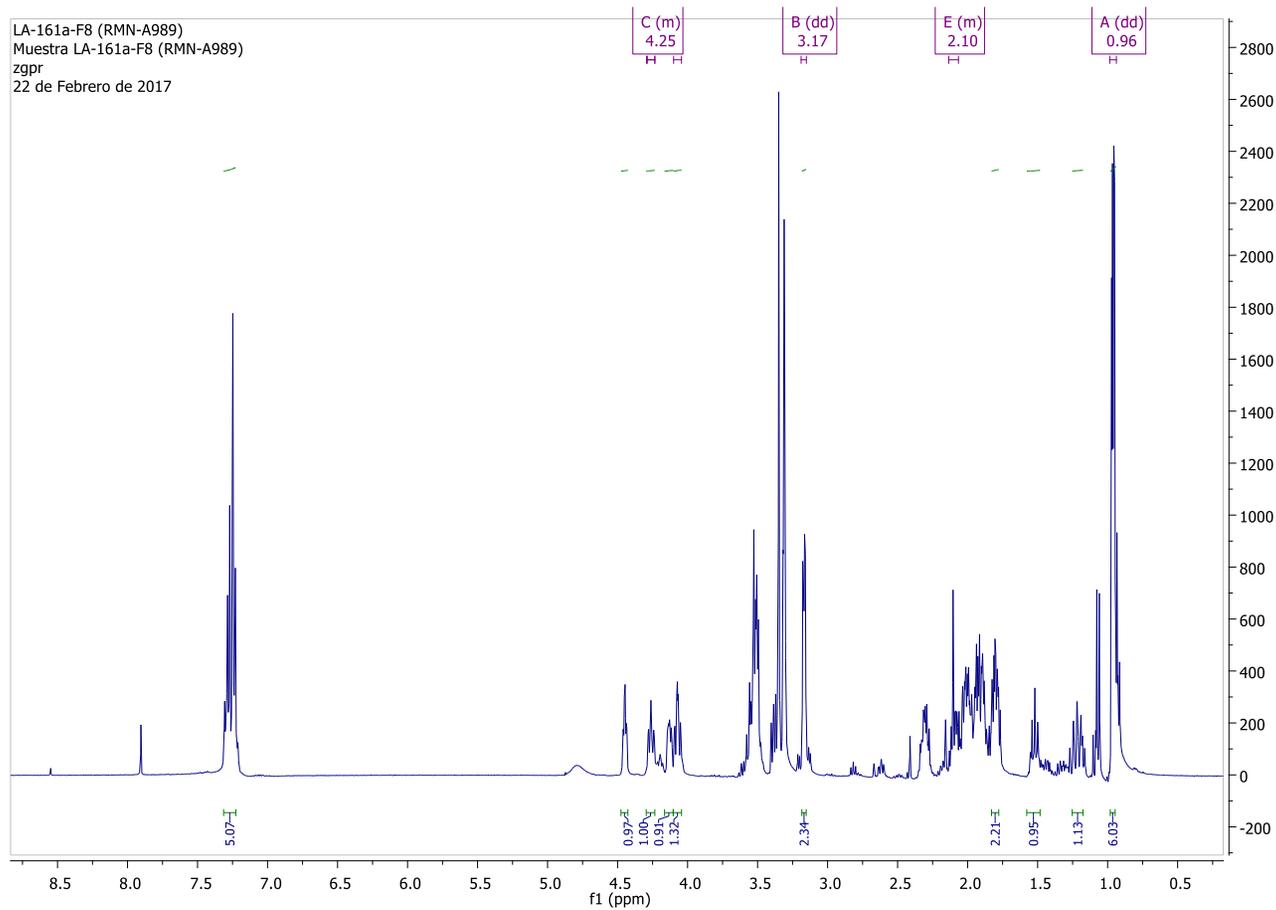
1881 446.6 40.9 C₂₆H₃₉NO₅ 445.6

Piericidina-C2; Piericidina-F

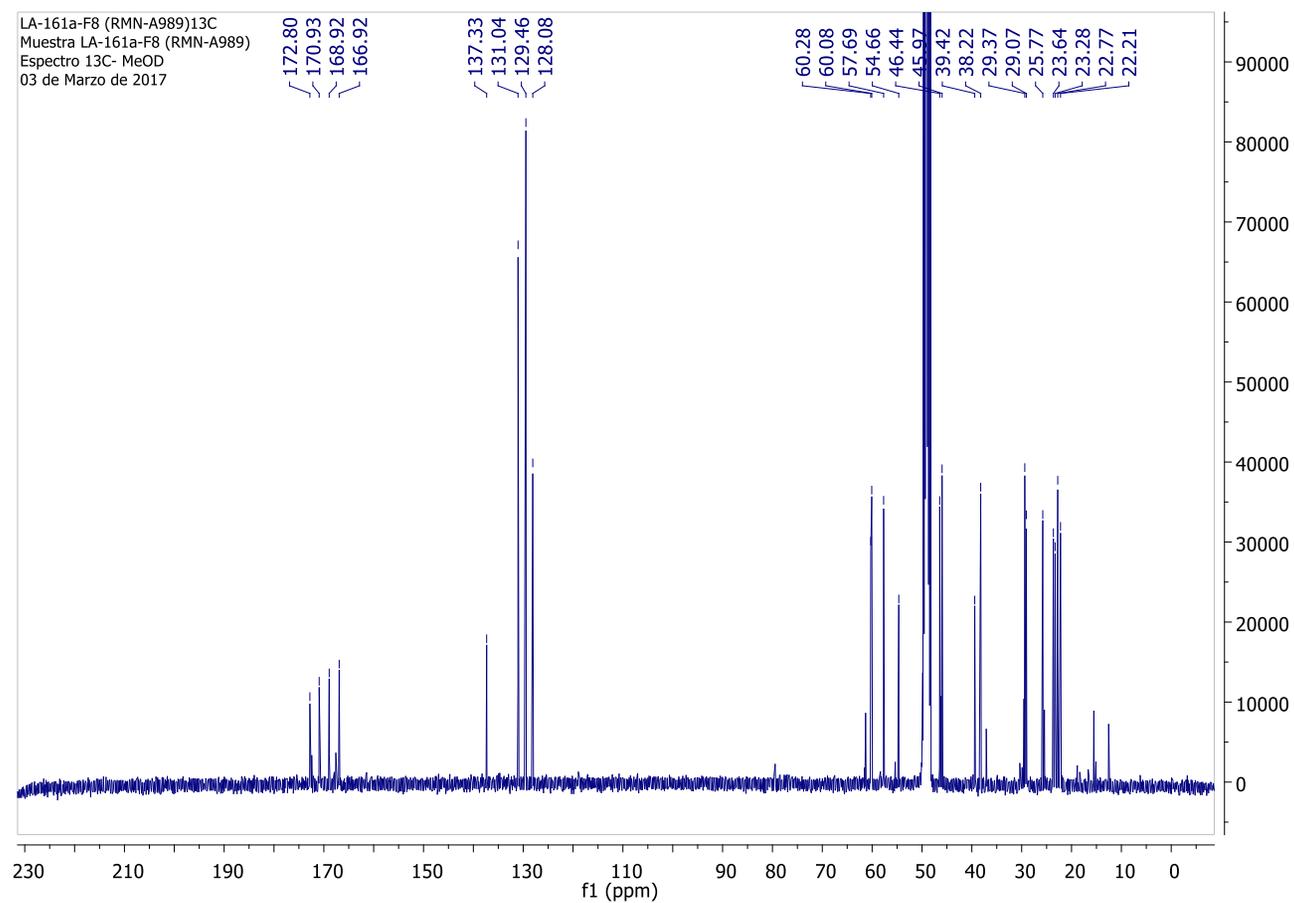
Fuente: *Streptomyces*
pieridicus, S.pactum



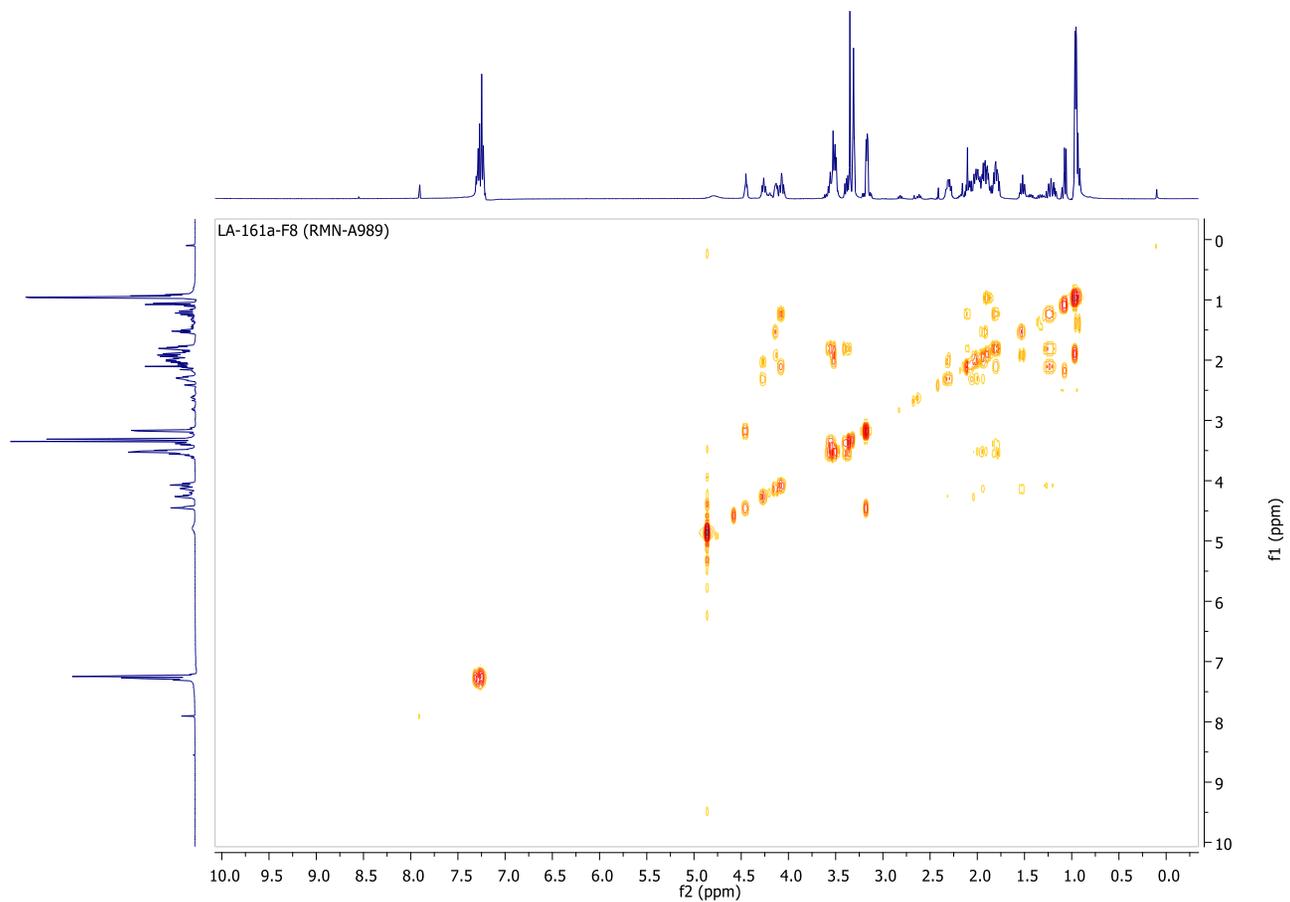
Anexo 5: RMN-¹H del compuesto 5.1 (CD₃OD, 400 MHz)



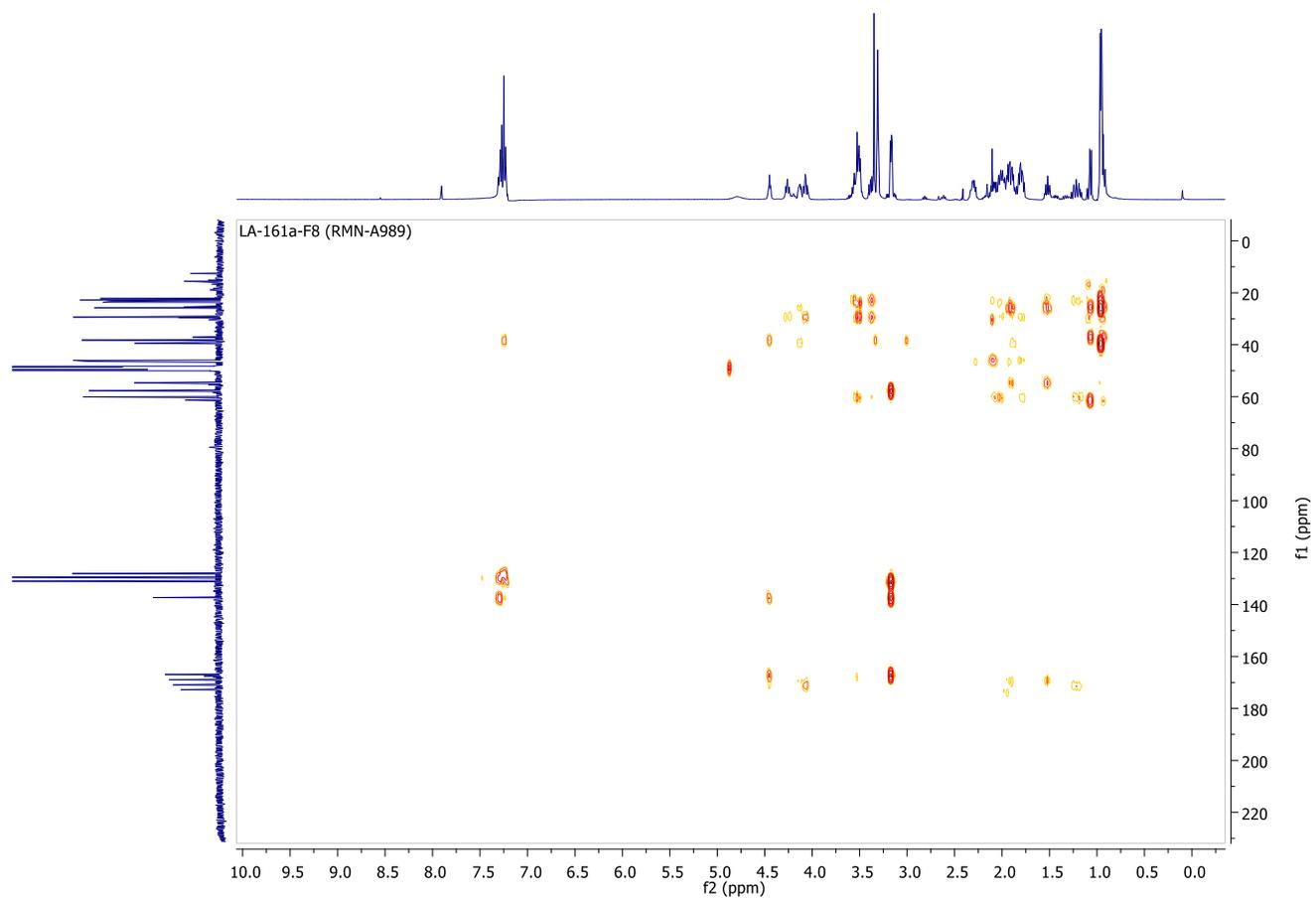
Anexo 6: RMN-¹³C del compuesto 5.1 (CD₃OD, 100 MHz)



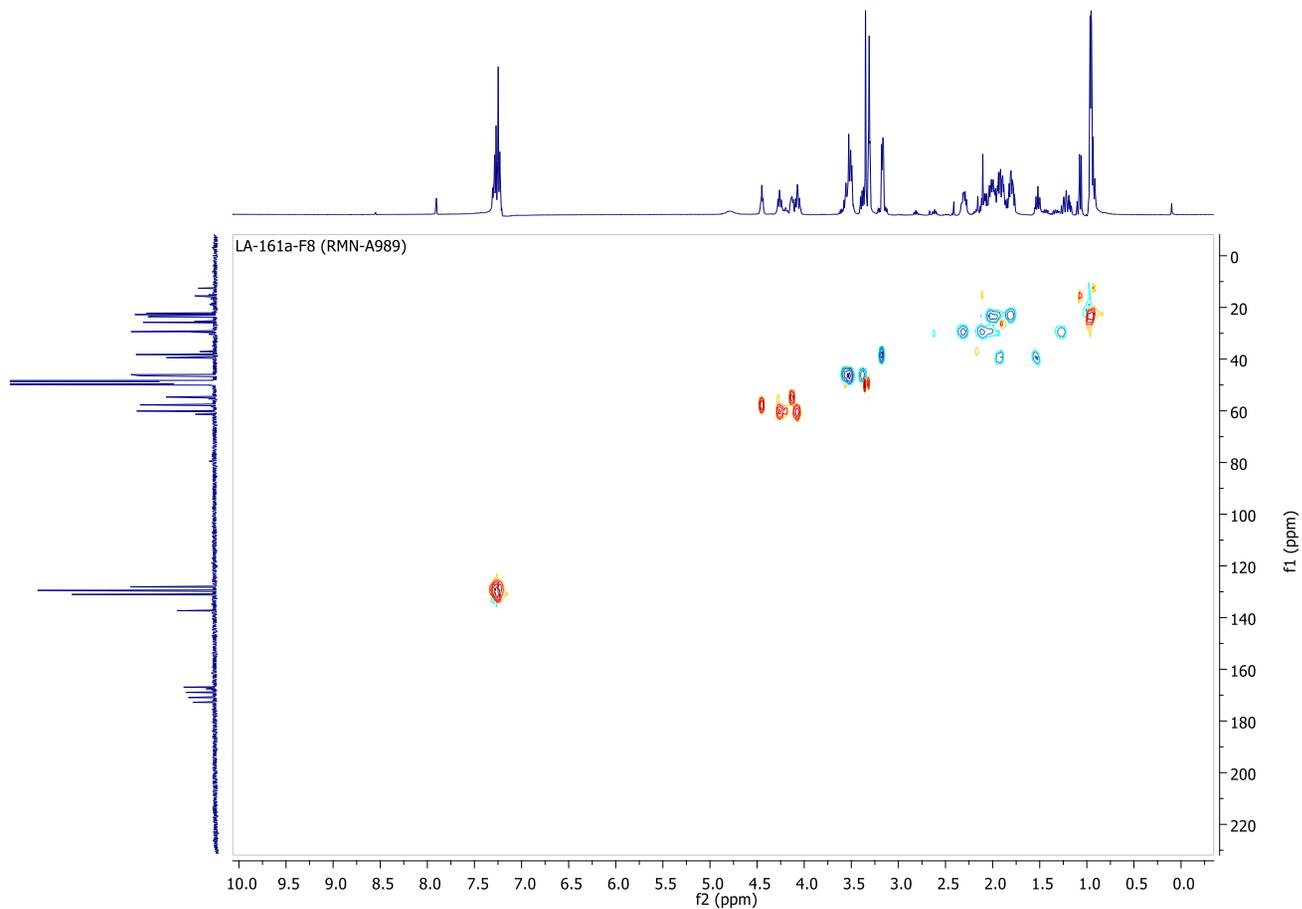
Anexo7: COSY del compuesto 5.1 (CD₃OD)



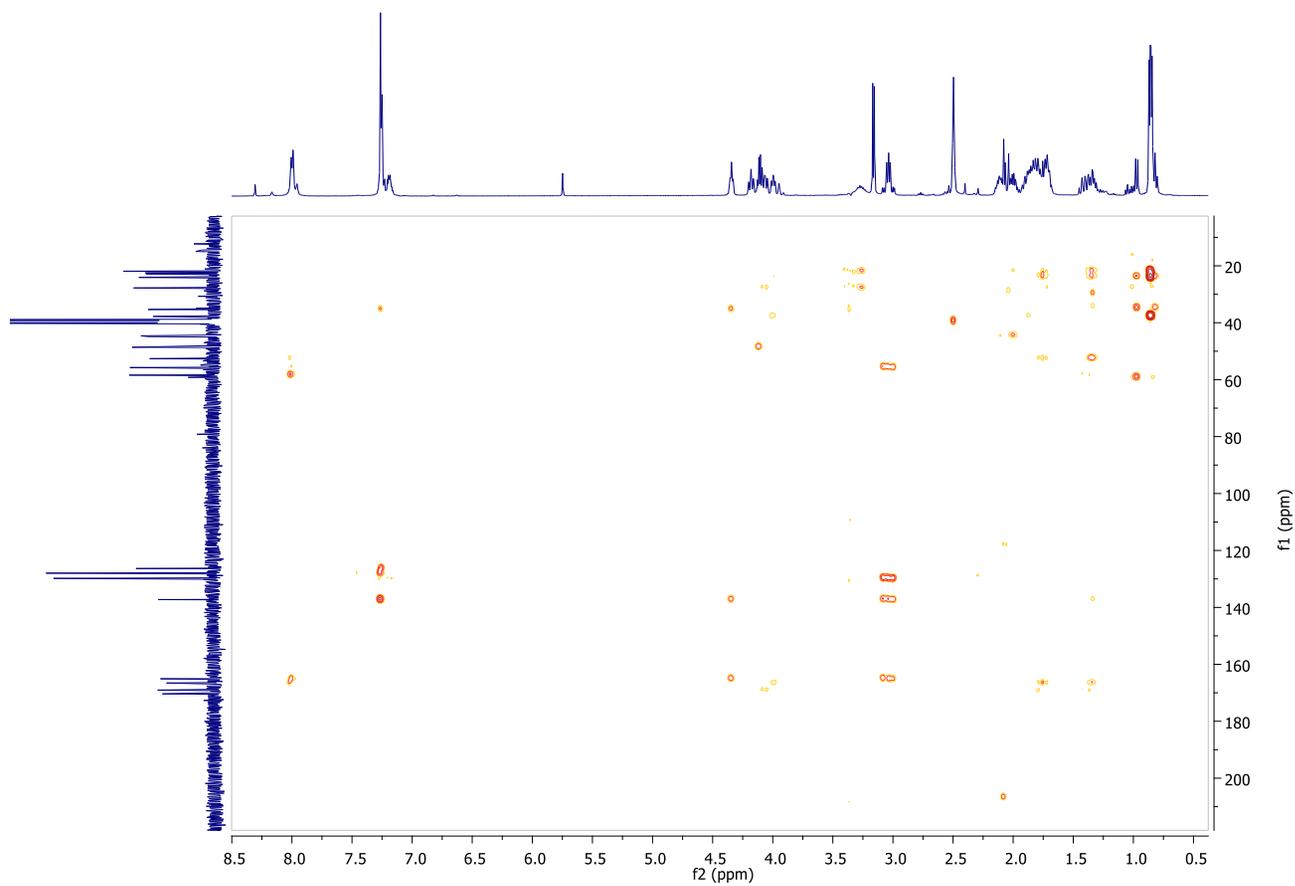
Anexo 8: HMBC del compuesto 5.1 (CD₃OD)



Anexo 9: HSQC del compuesto 5.1 (CD₃OD)

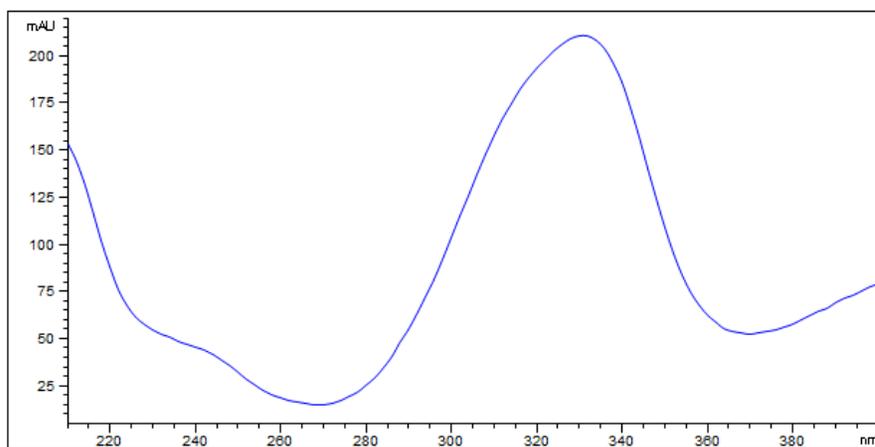


Anexo 10: HMBC del compuesto 5.1 (DMSO)

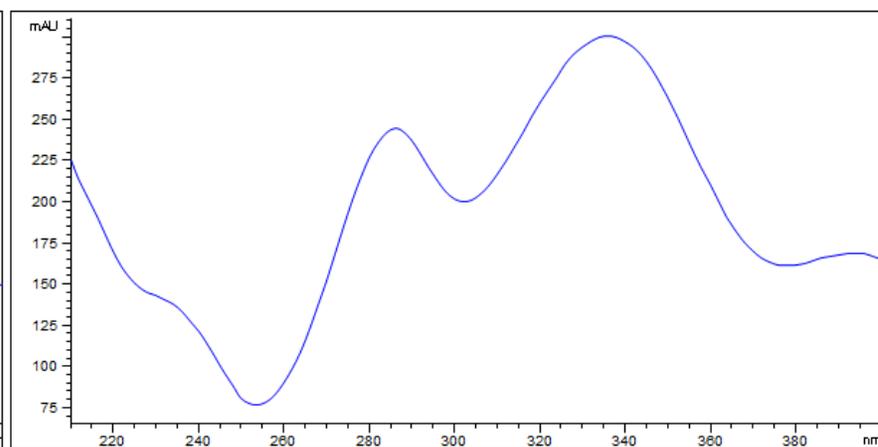


Anexo 11: Espectros UV del derivado L-FDAA-L-Prolina y el pico cromatográfico con tiempo de retención 5.943 min

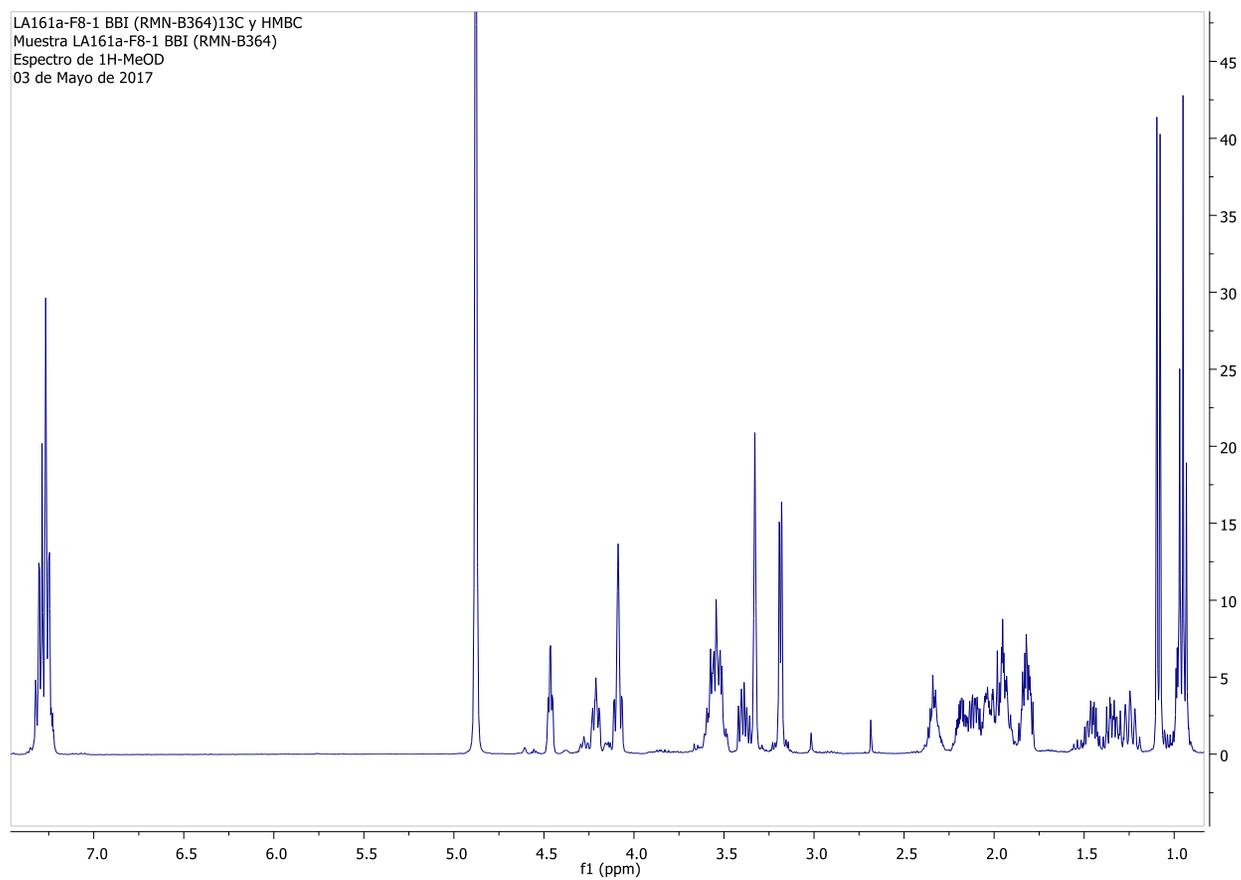
1) L-FDAA-L-prolina

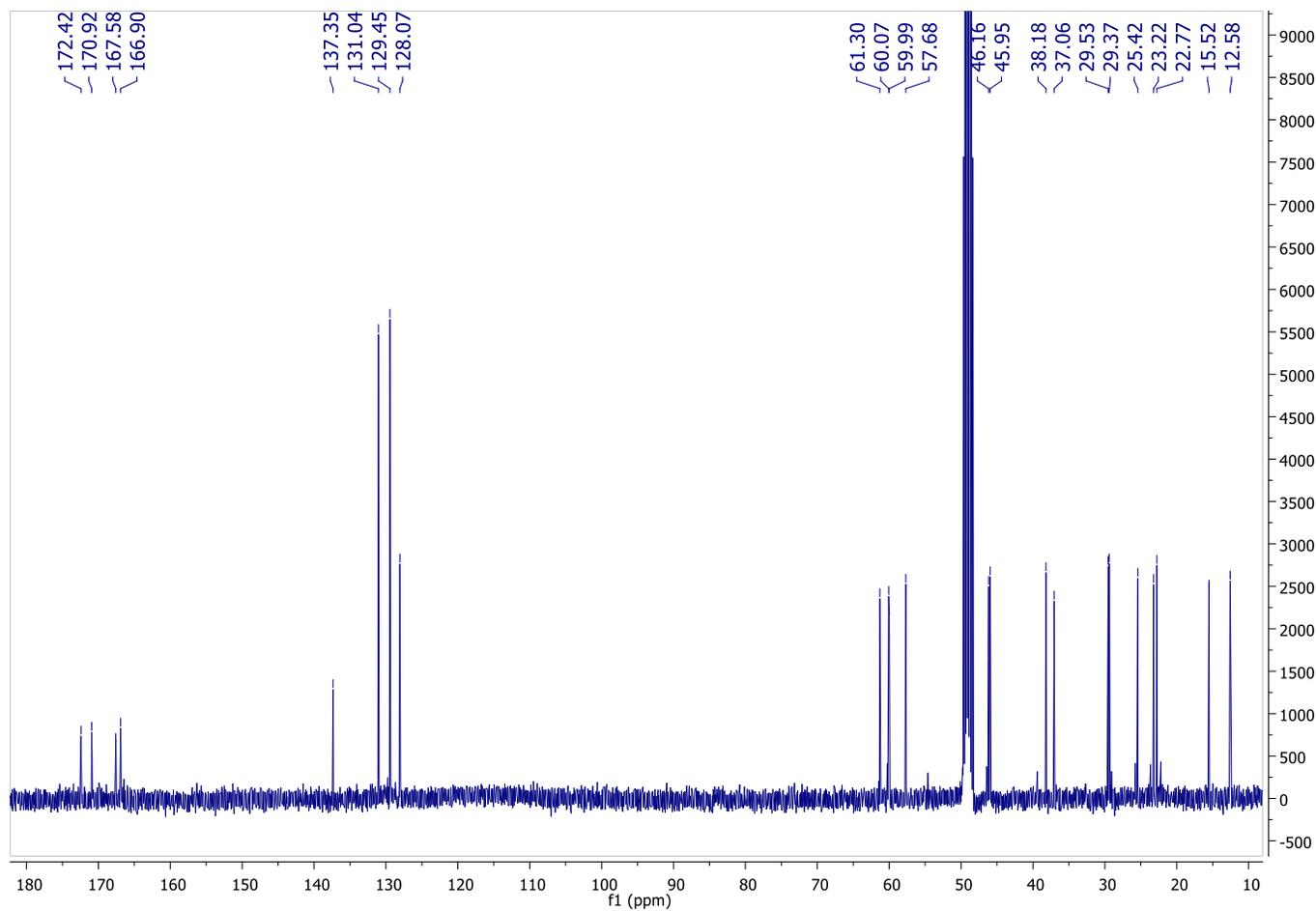


2) Compuesto no identificado

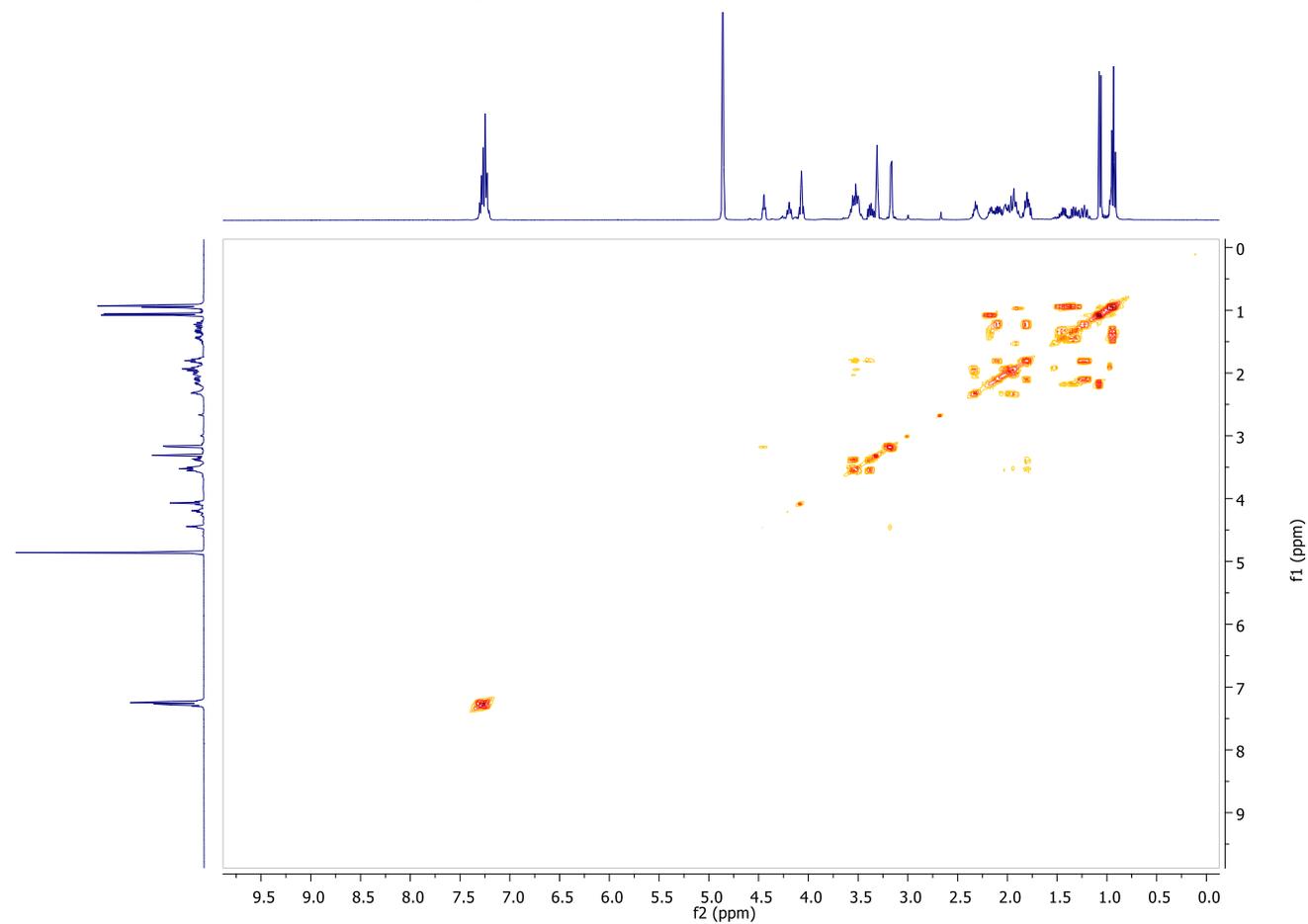


Anexo 12: RMN-¹H del compuesto 5.2 (CD₃OD , 400 MHz)

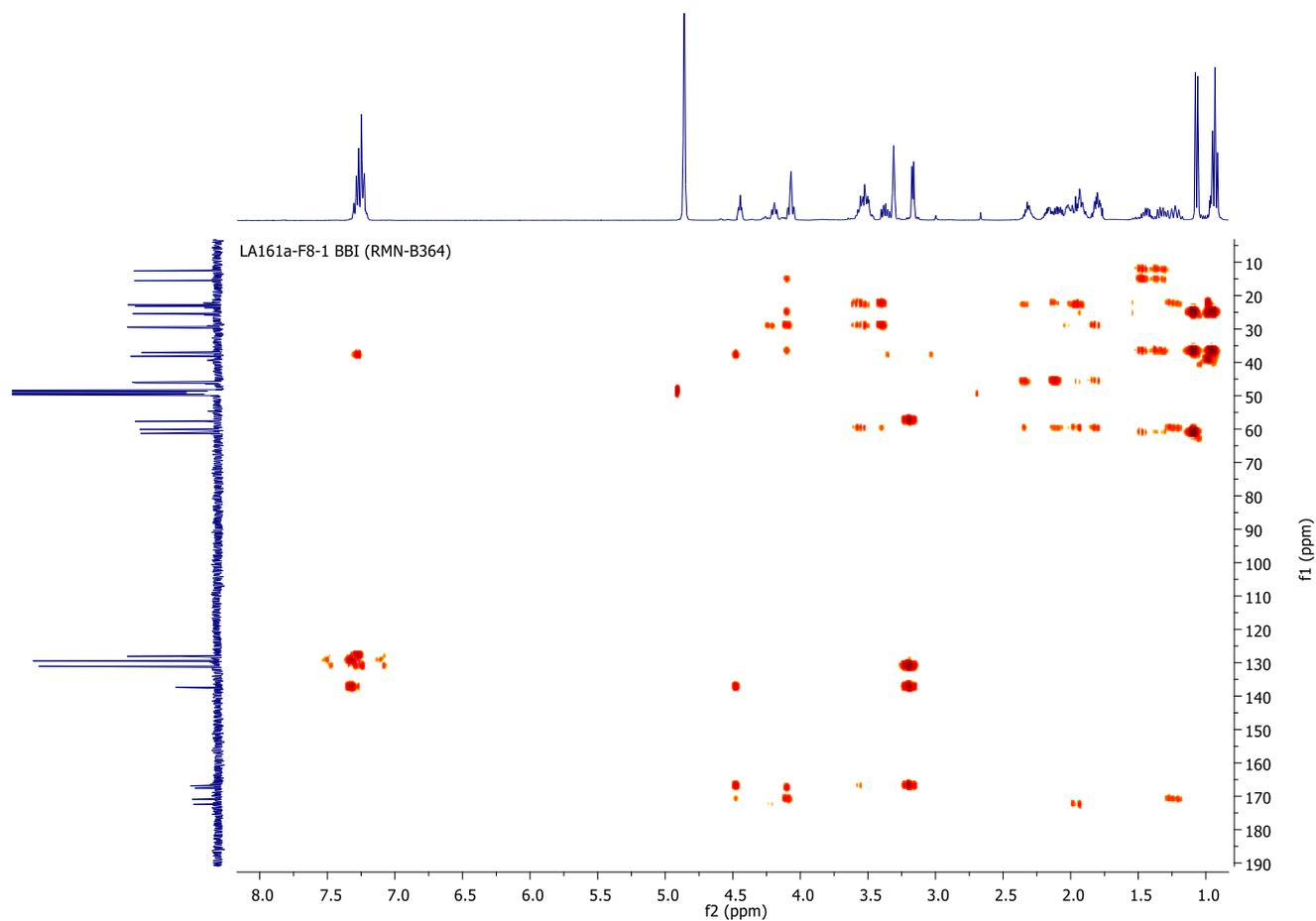


Anexo 13: RMN-¹³C del compuesto 5.2 (CD₃OD, 100 MHz)

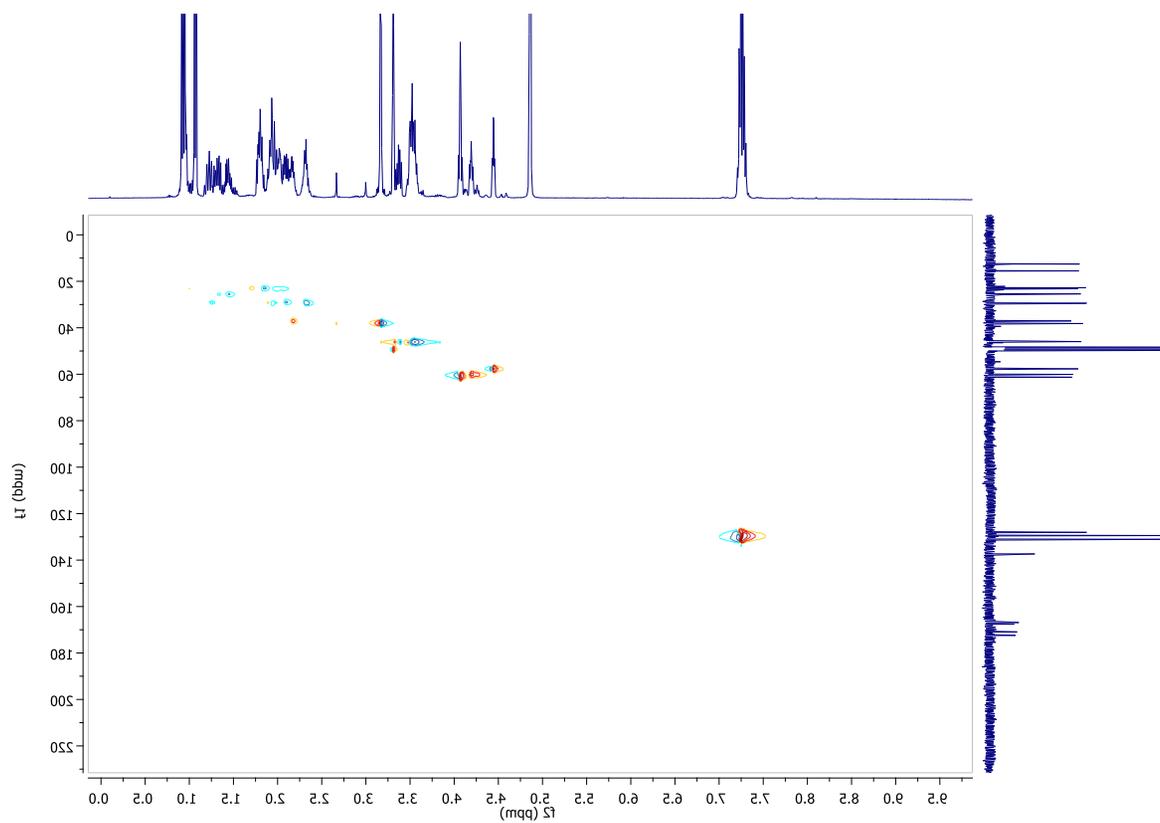
Anexo 14: COSY del compuesto 5.2 (CD₃OD)



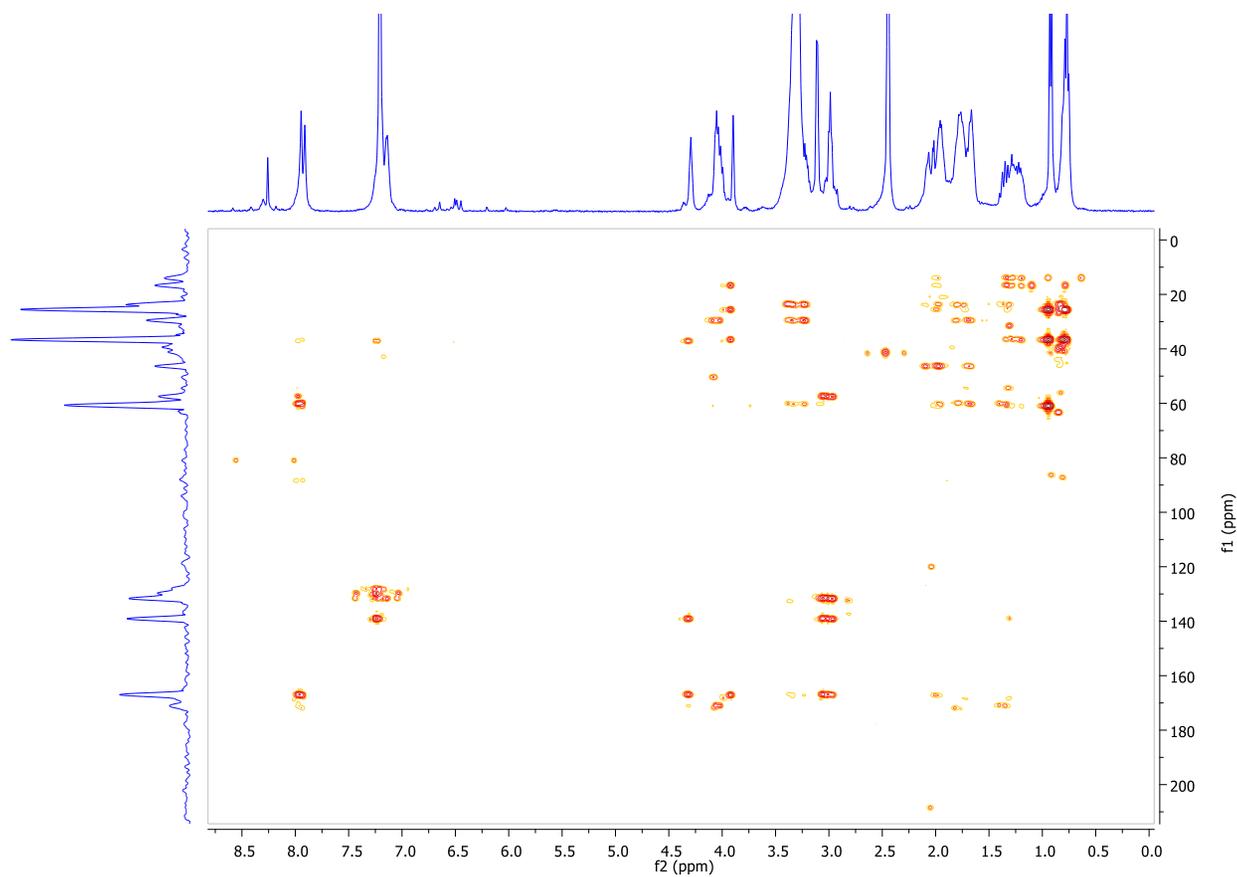
Anexo 15: HMBC del compuesto 5.2 (CD₃OD)

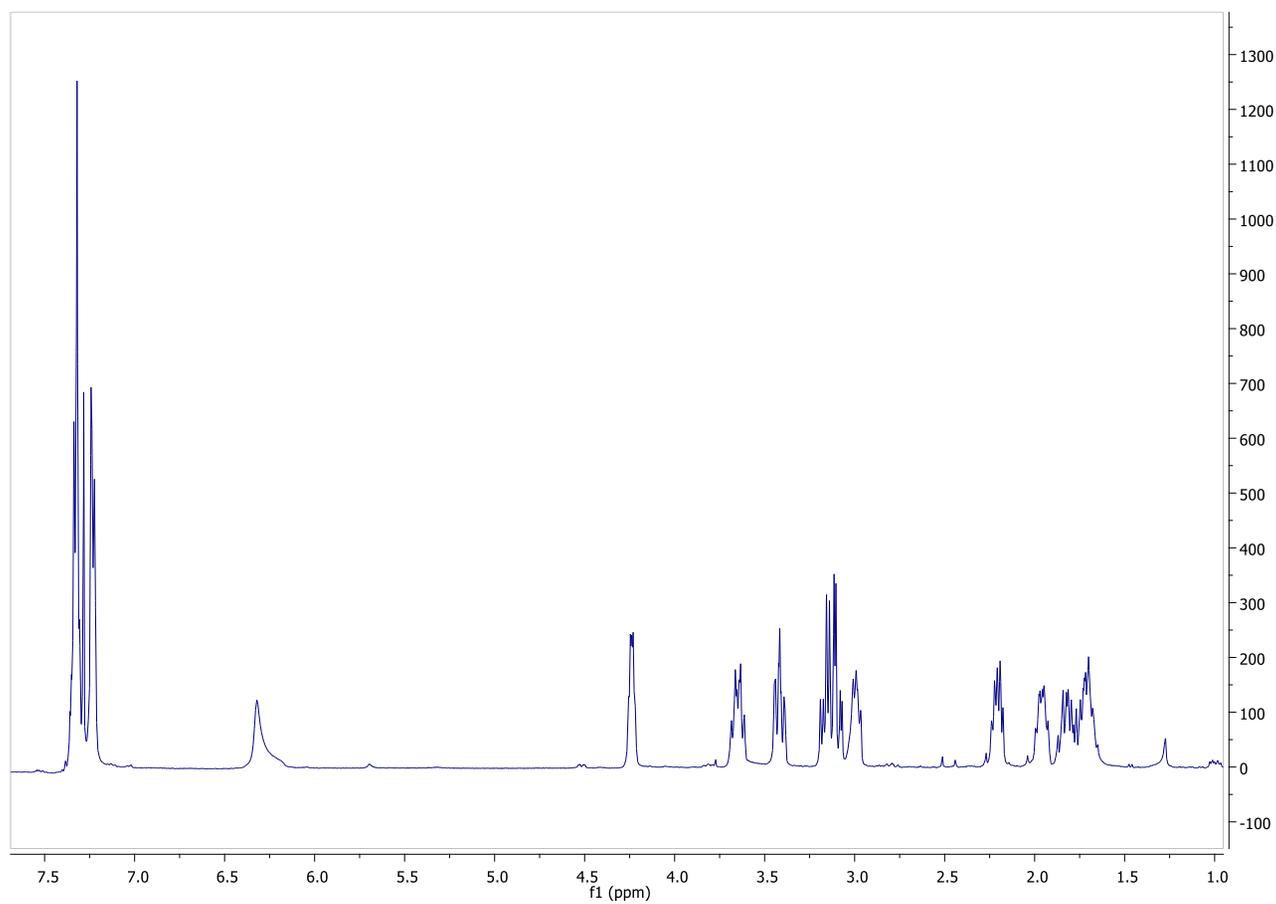


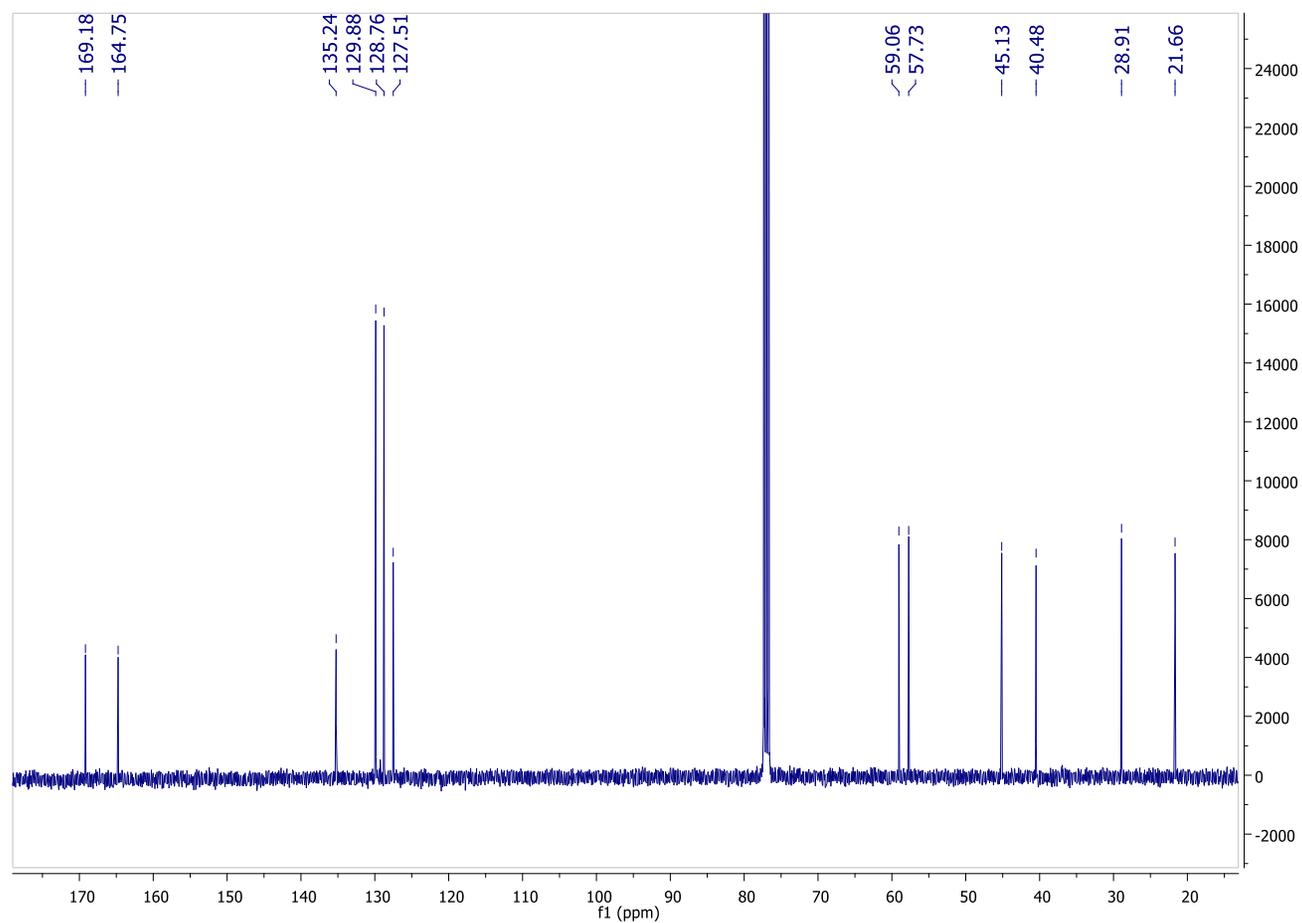
Anexo 16: HSQC del compuesto 5.2 (CD₃OD).



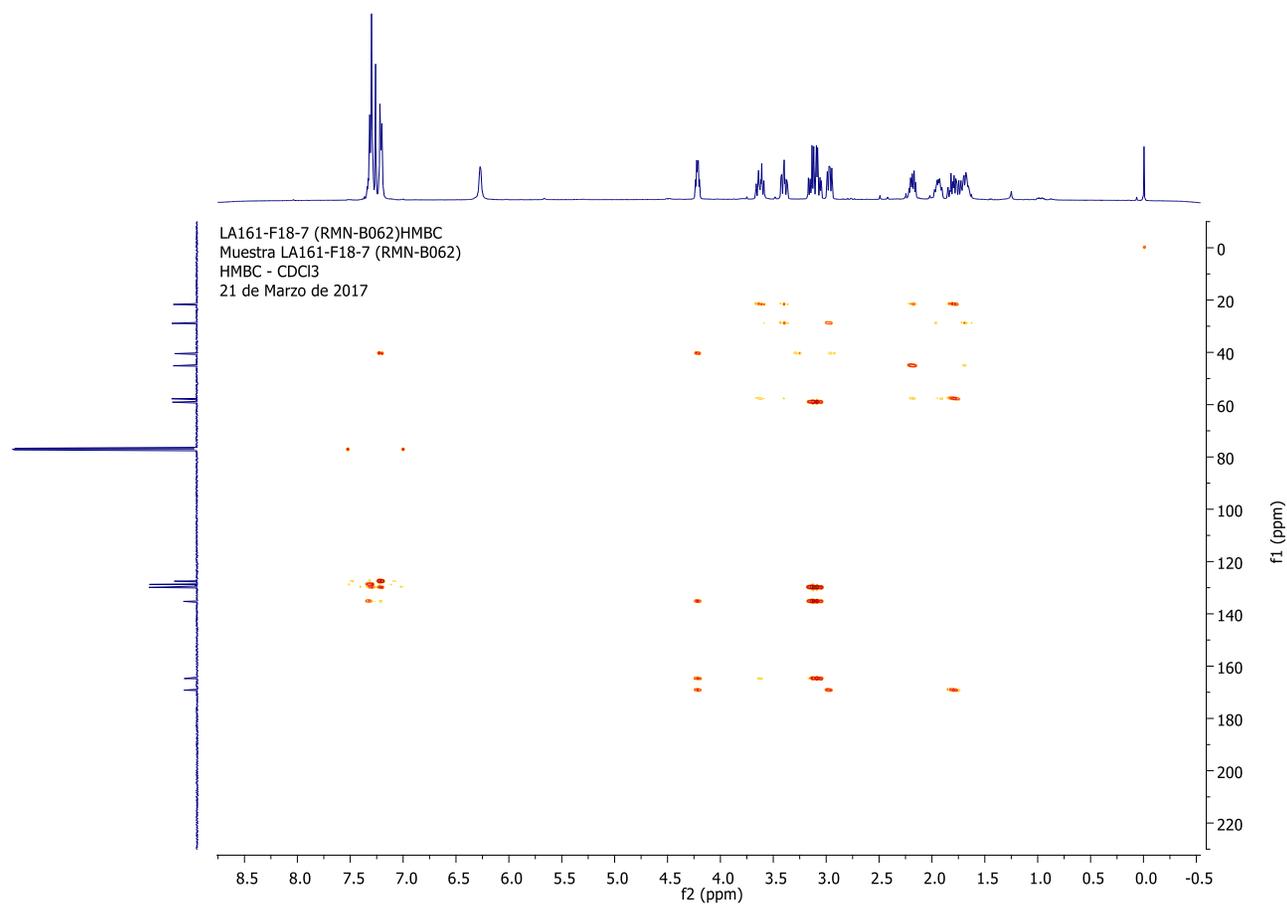
Anexo 17: HMBC del compuesto 5.2 (DMSO, 400 MHz).



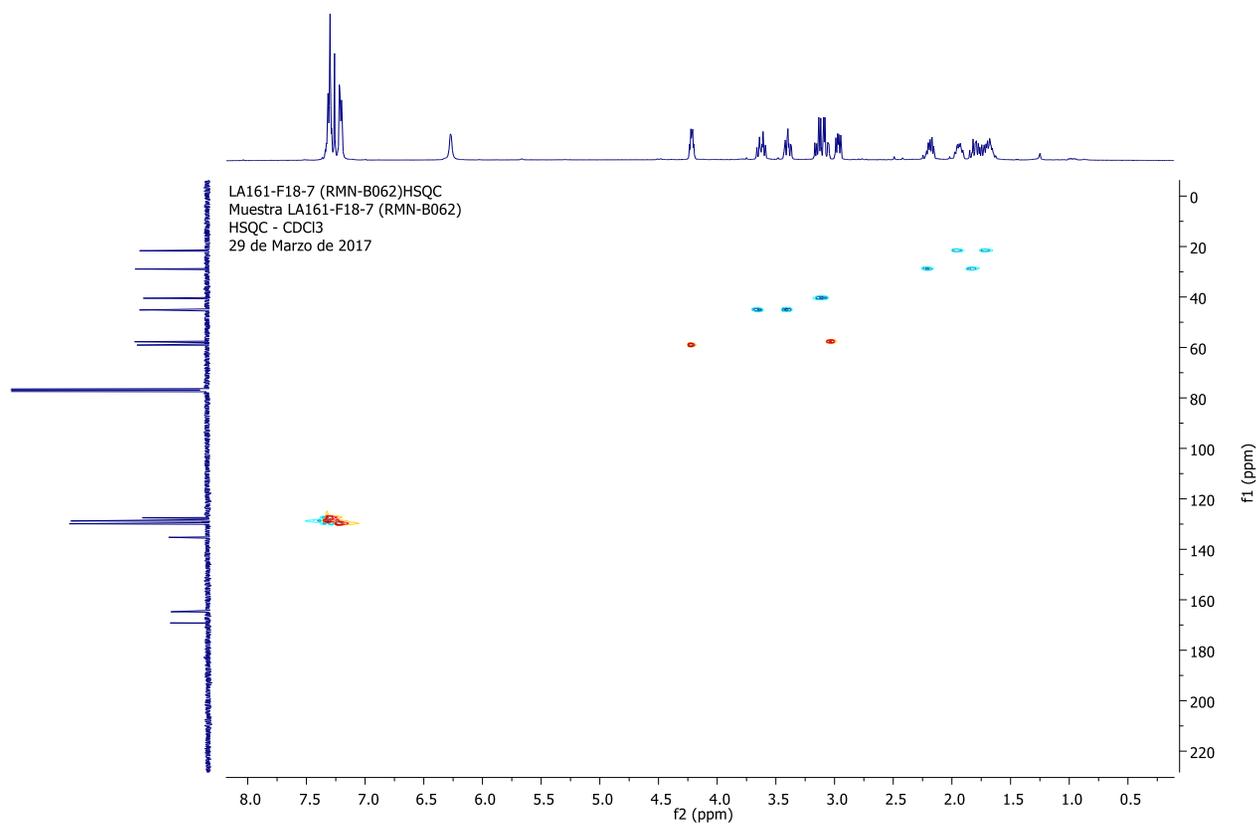
Anexo18: RMN-¹H del compuesto 5.3 (CDCl₃, 400 MHz).

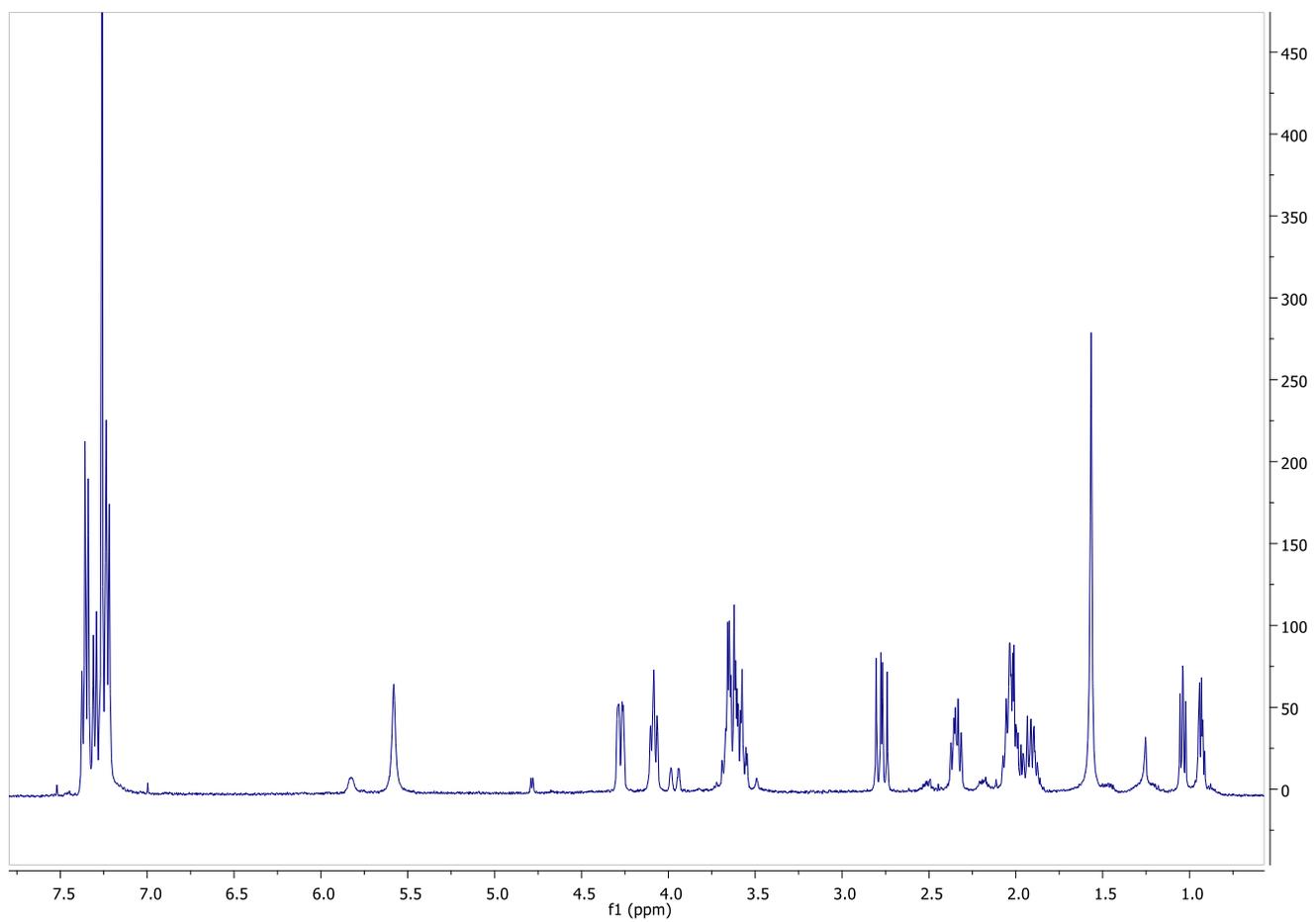
Anexo 19: RMN-¹³C del compuesto 5.3 (CDCl₃ 100 MHz).

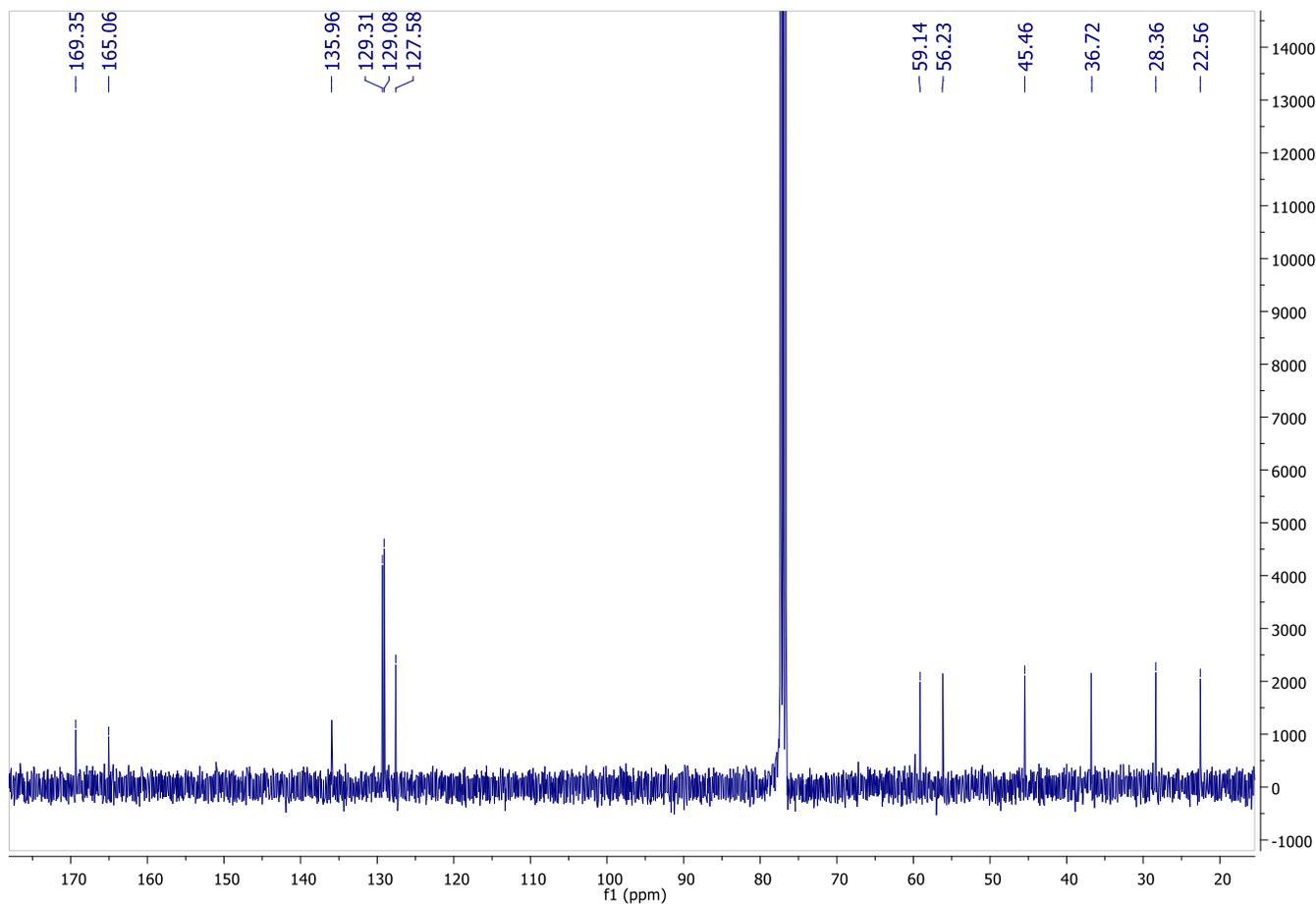
Anexo 20: HMBC del compuesto 5.3 (CDCl₃).



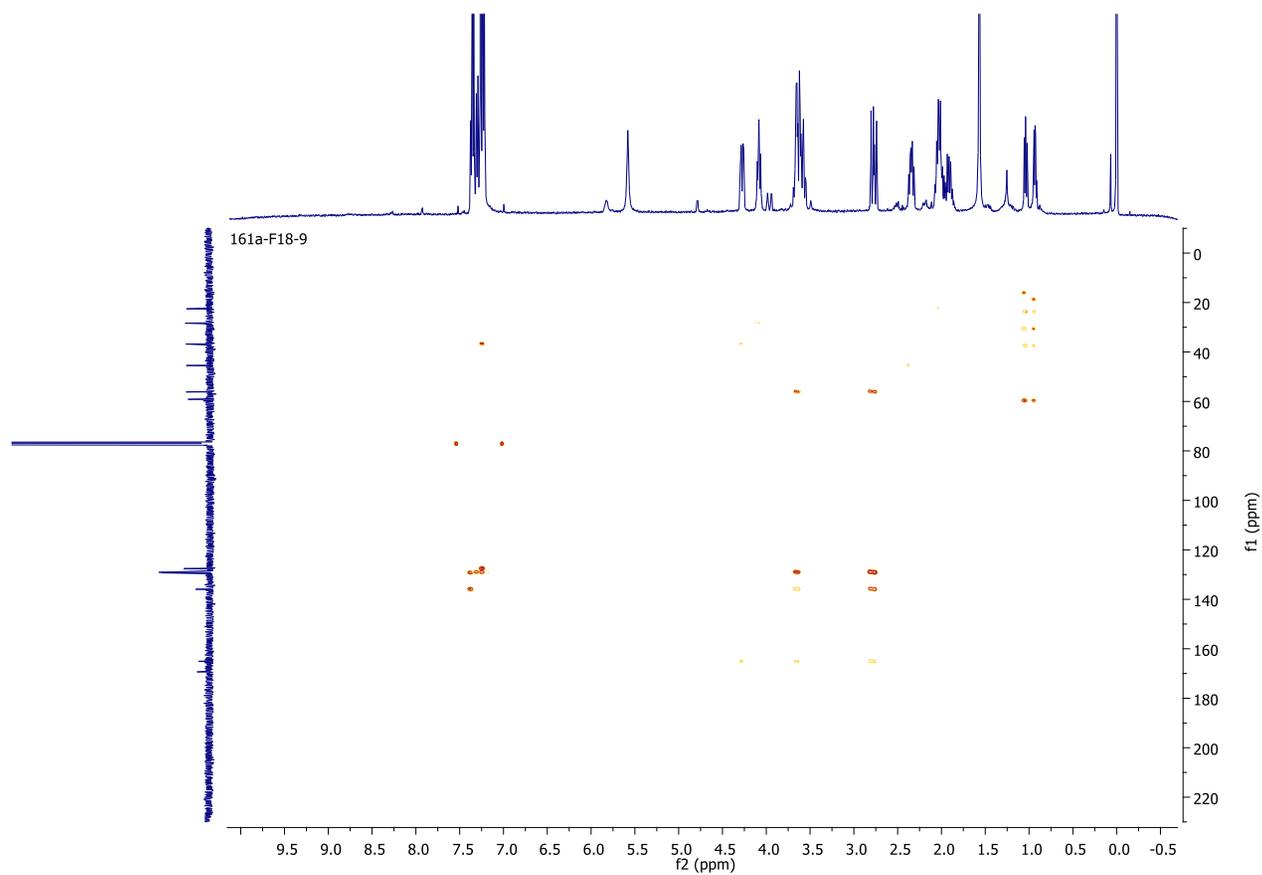
Anexo 21: HSQC del compuesto 5.3 (CDCl₃).



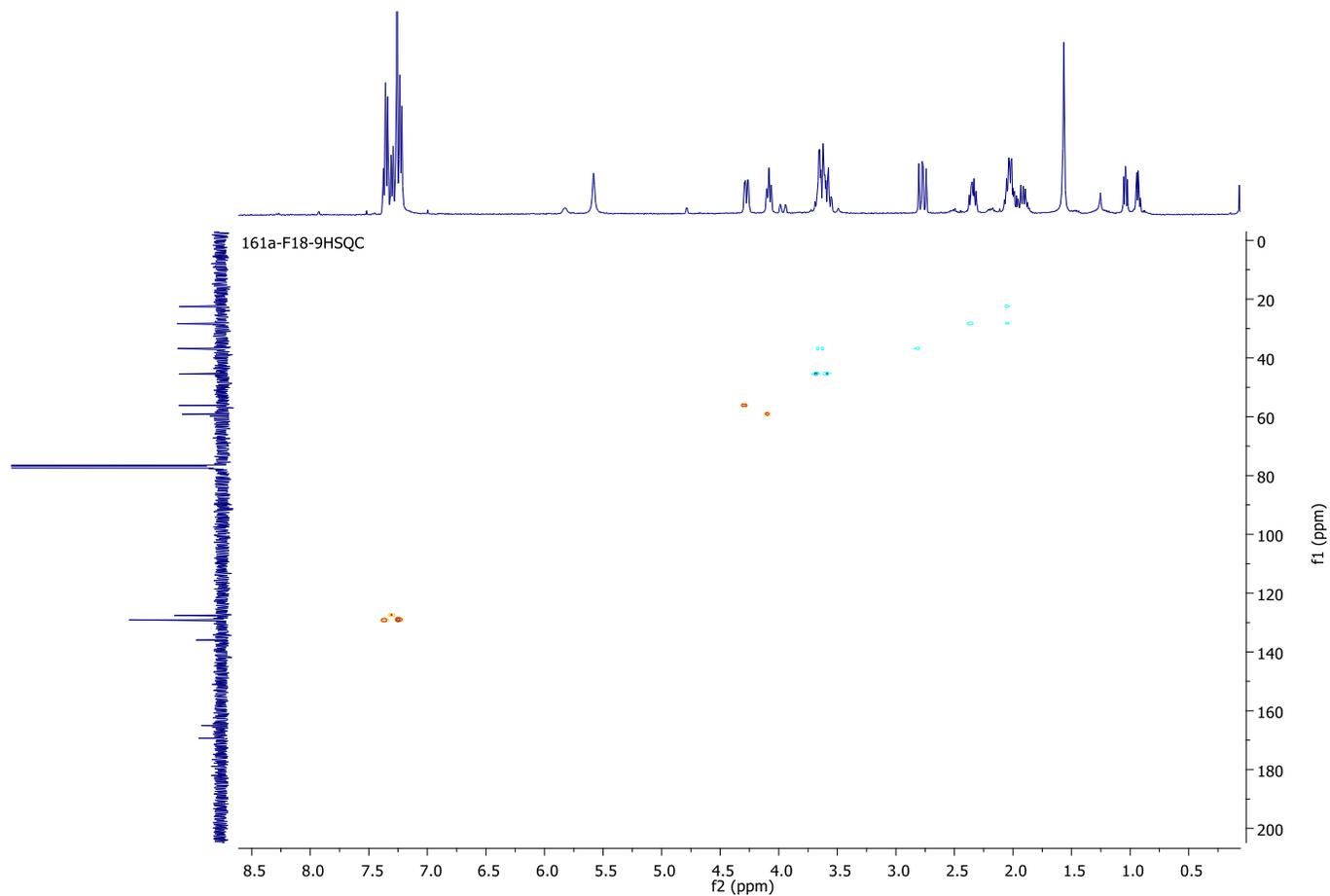
Anexo 22: RMN-¹H del compuesto 5.4 (CDCl₃, 400 MHz).

Anexo 23: RMN-¹³C del compuesto 5.4 (CDCl₃ 100 MHz).

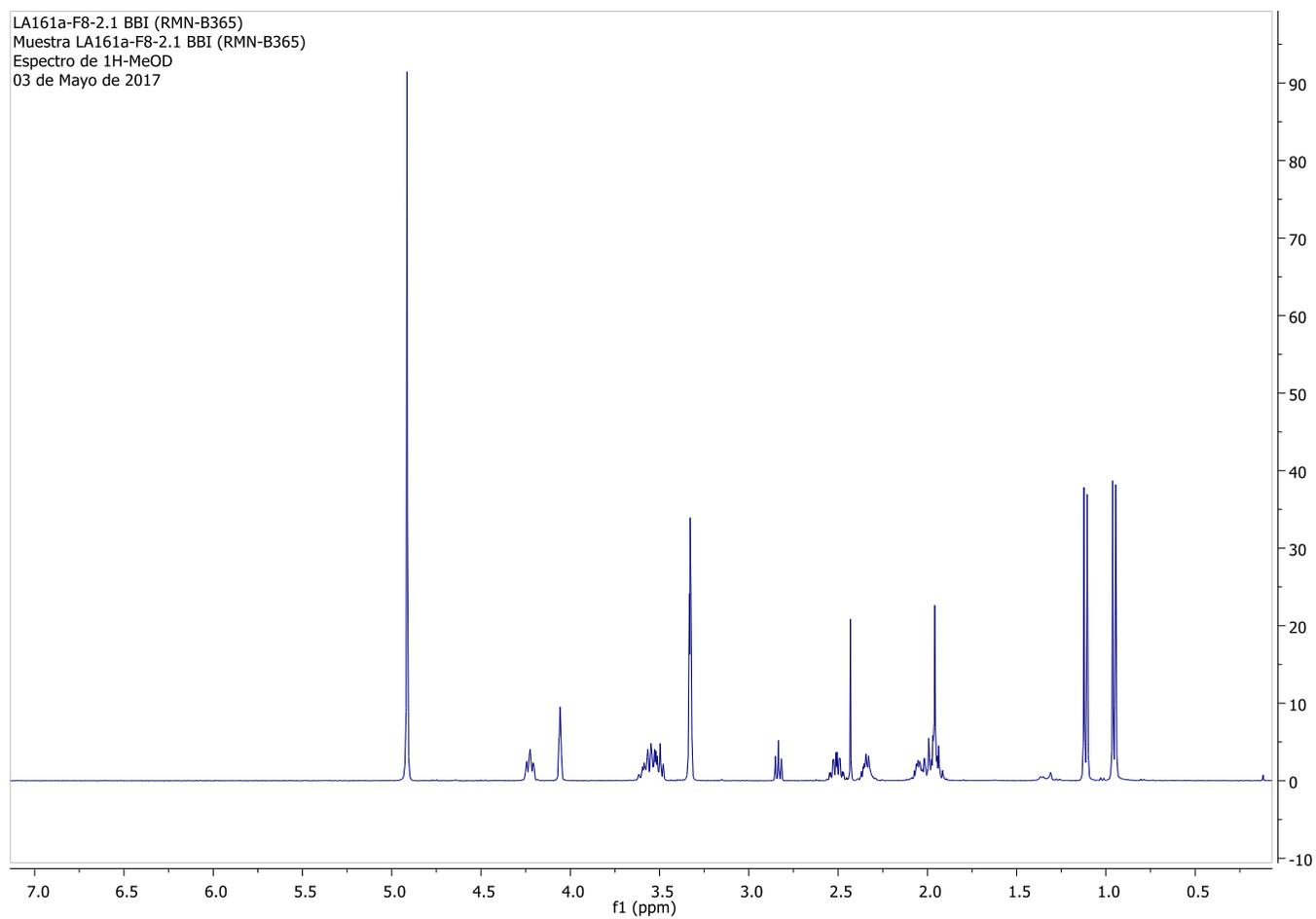
Anexo 24: HMBC del compuesto 5.4 (CDCl₃)

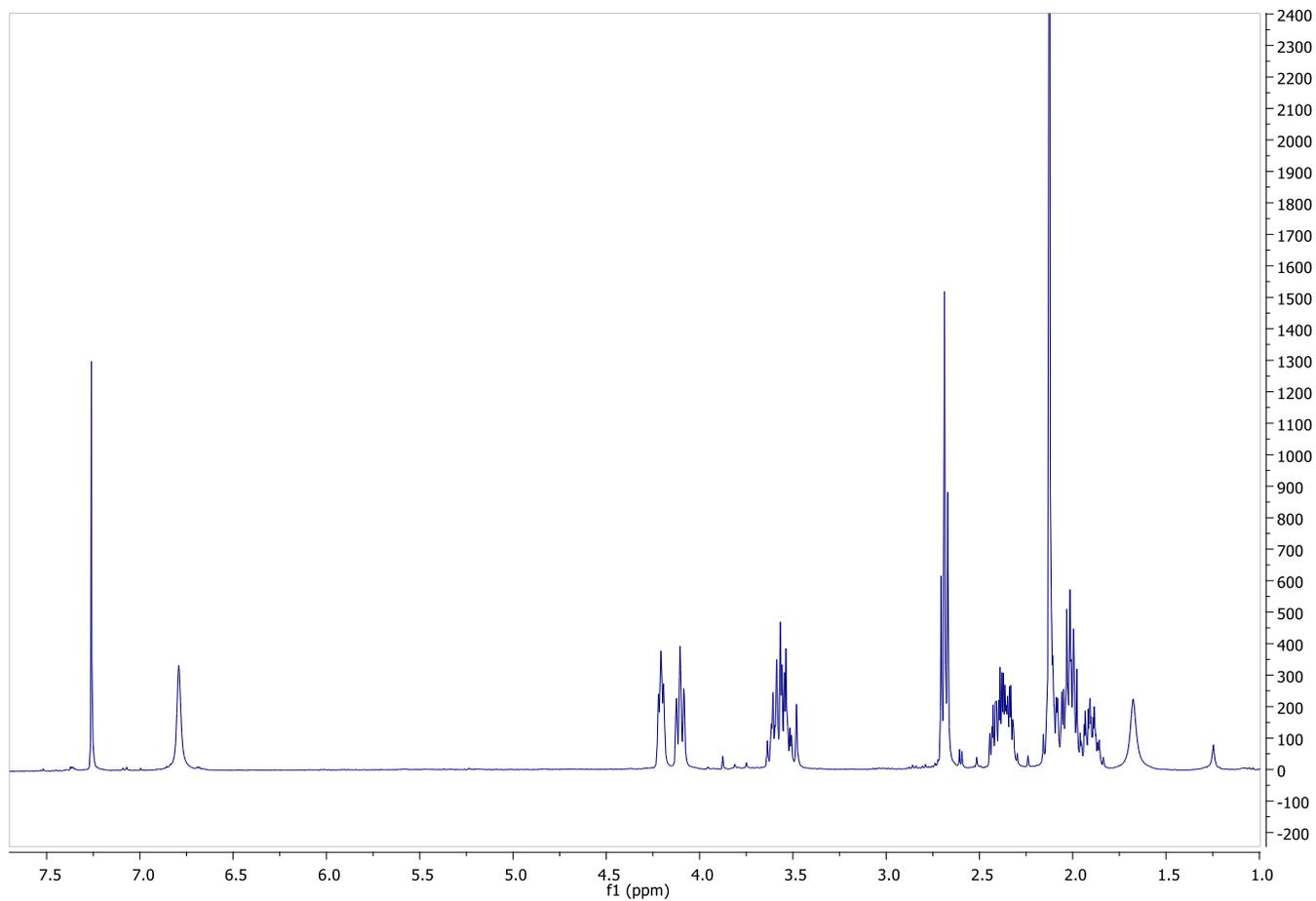


Anexo 25: HSQC del compuesto 5.4 (CDCl₃).

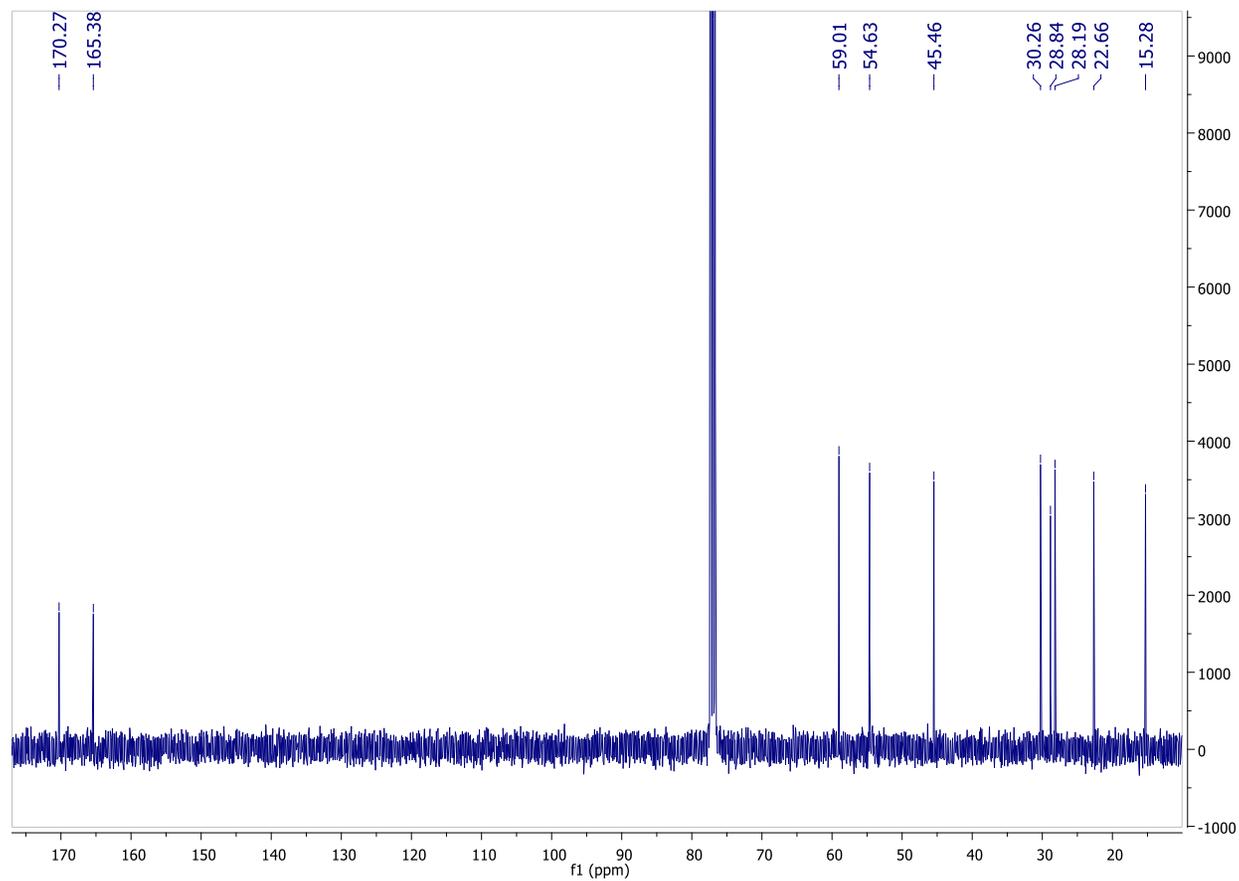


Anexo 26: RMN-¹H del compuesto 5.5 (CD₃OD, 400 MHz).

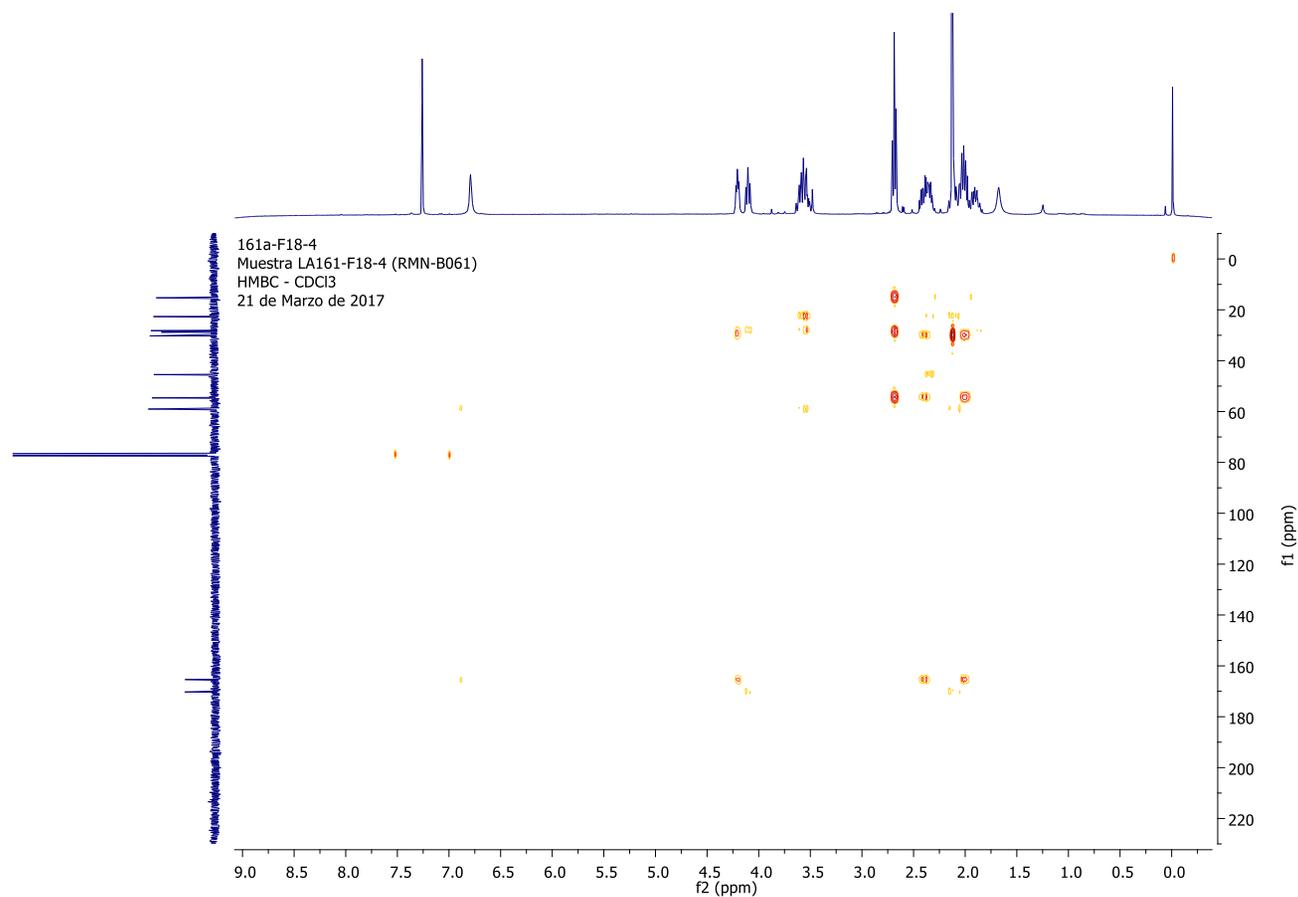


Anexo 27: RMN-¹H del compuesto 5.6 (CDCl₃, 400 MHz).

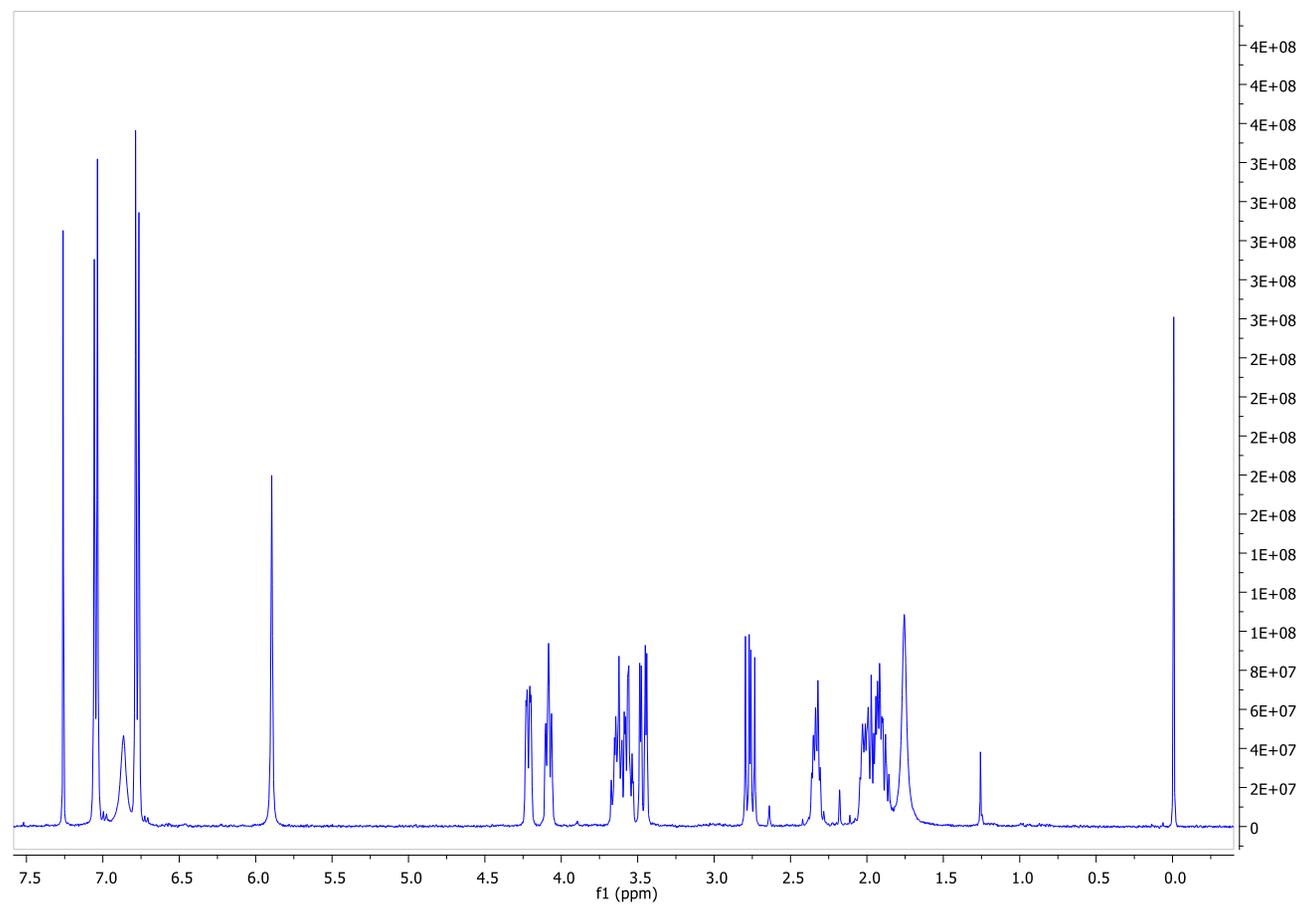
Anexo 28: RMN- ^{13}C del compuesto 5.6 (CDCl_3 100 MHz).



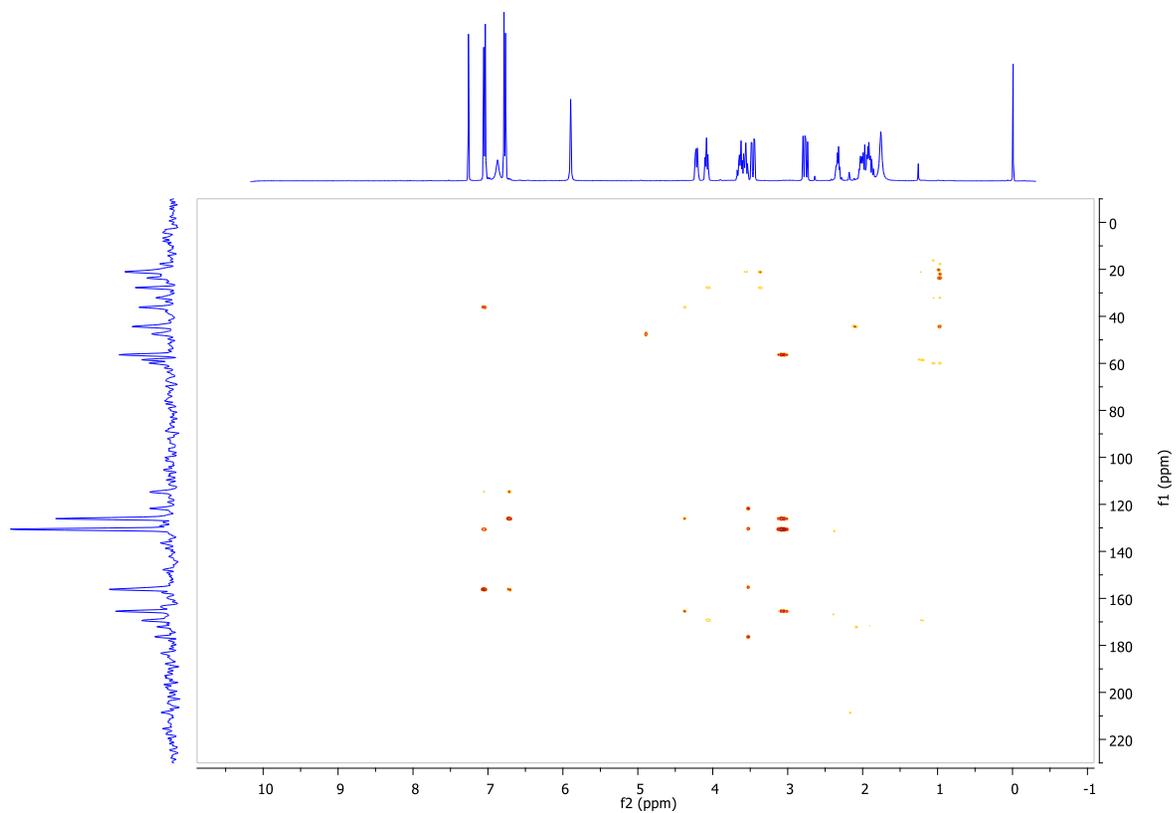
Anexo 29: HMBC del compuesto 5.6 (CDCl₃ 400 MHz)



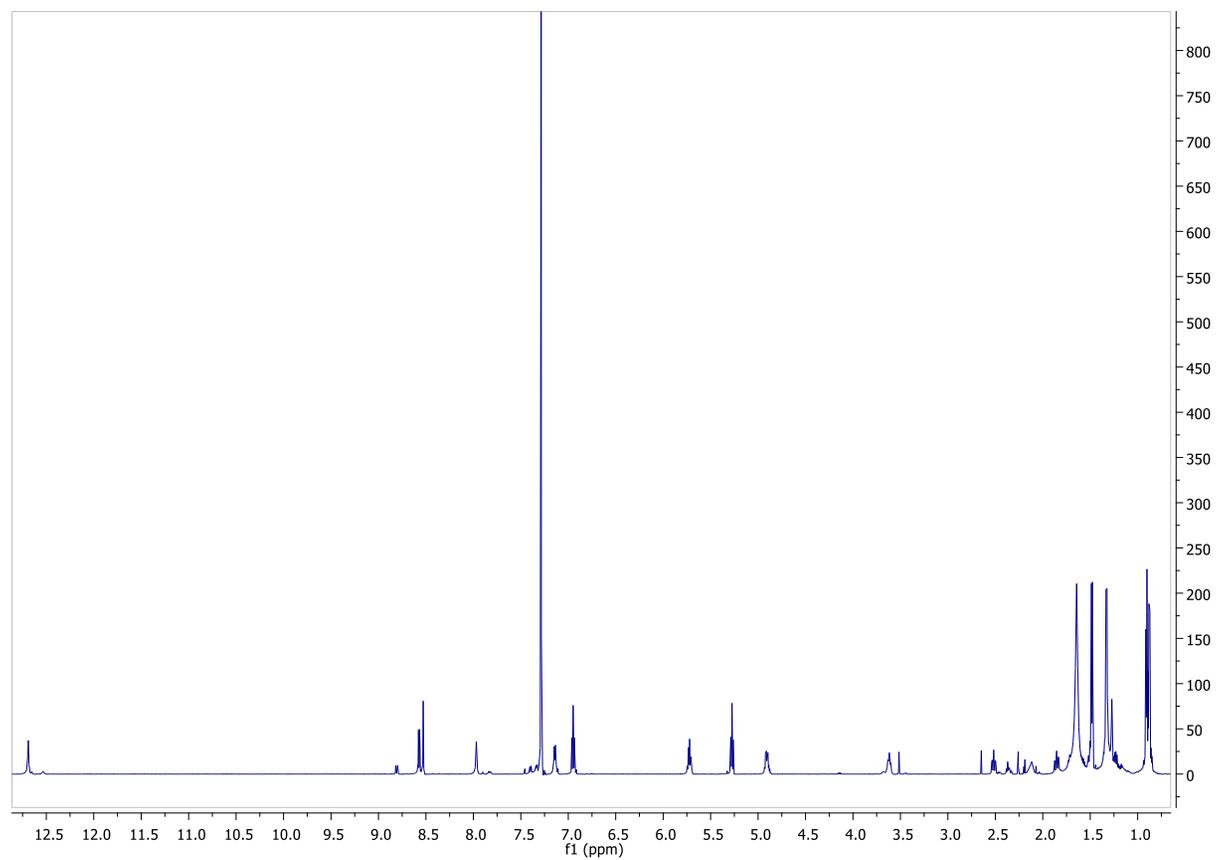
Anexo 30: RMN-¹H del compuesto 5.7 (CDCl₃, 400 MHz)



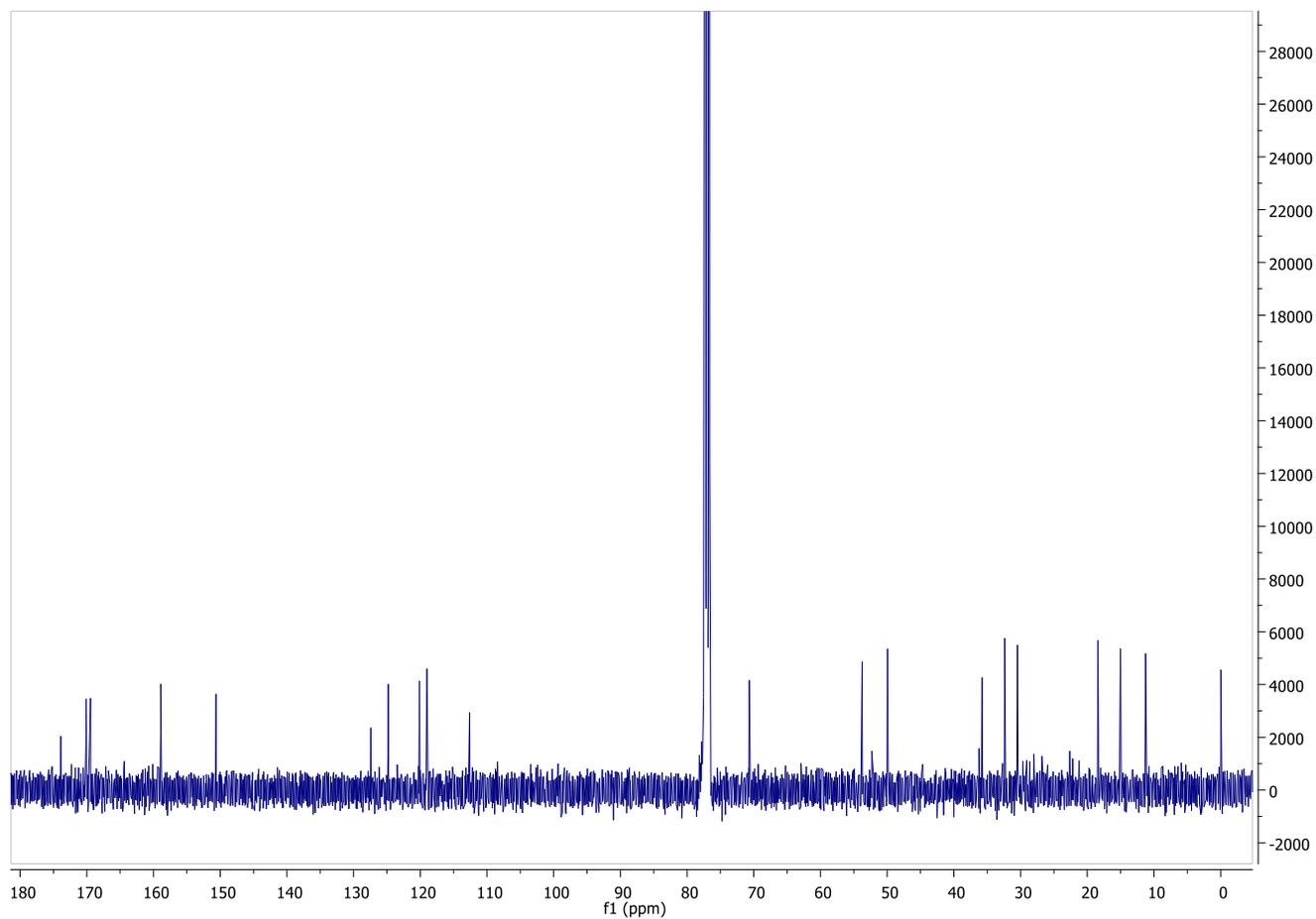
Anexo 31: HMBC del compuesto 5.7 (CDCl₃).



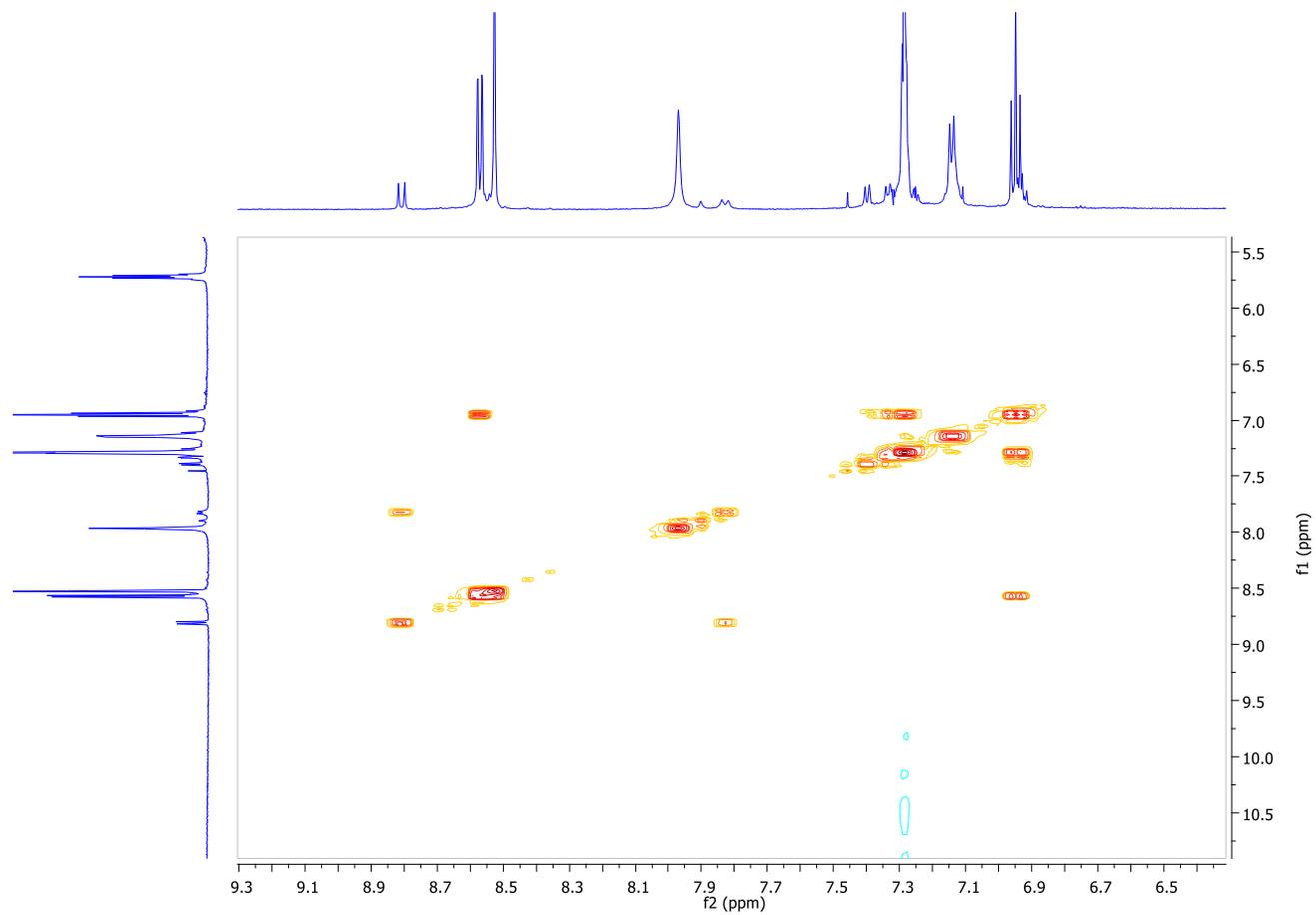
Anexo 32: RMN-¹H del compuesto 6.1 CDCl₃, (600 MHz)



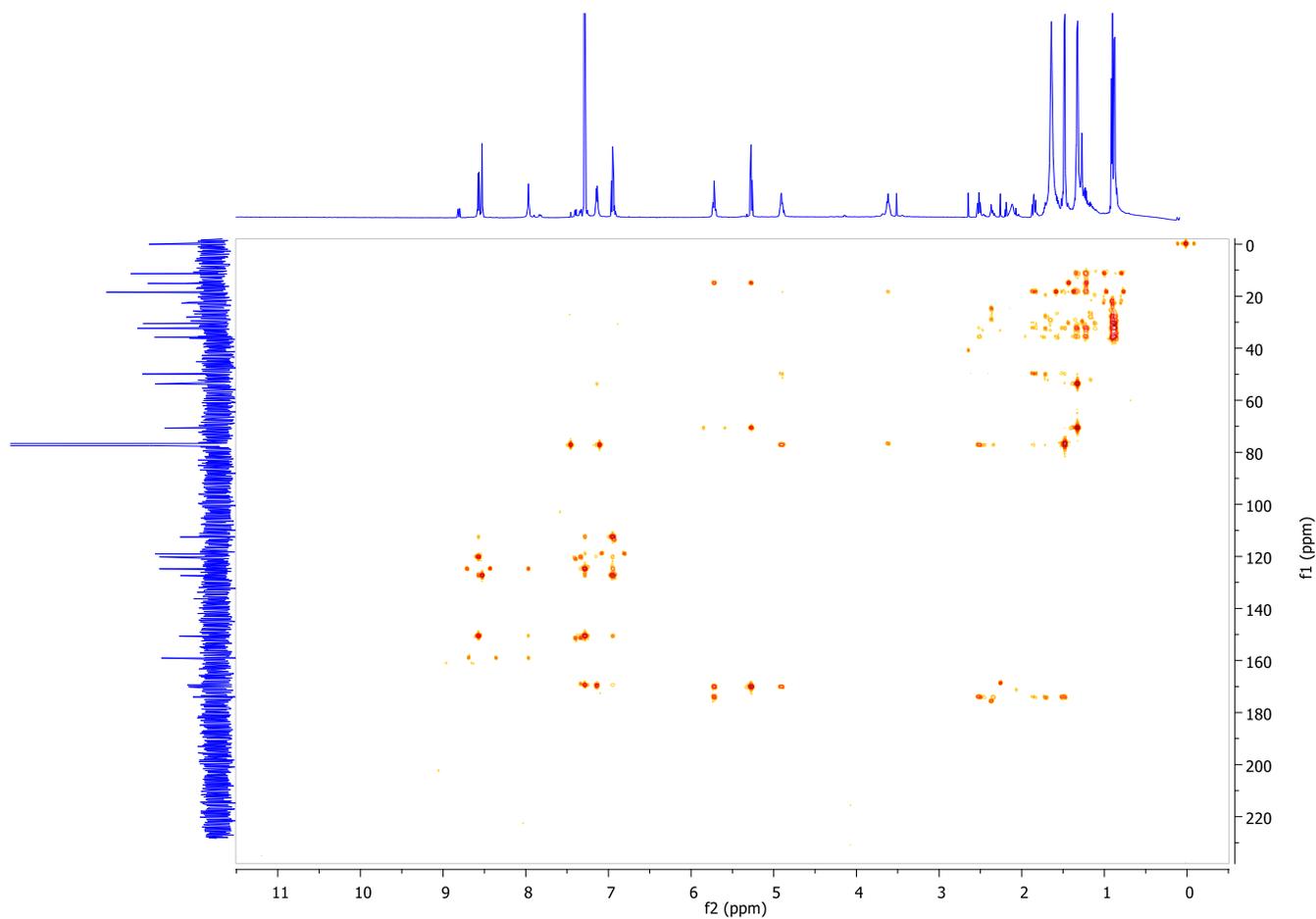
Anexo 33: RMN- ^{13}C del compuesto 6.1 CDCl_3 , (150 MHz)



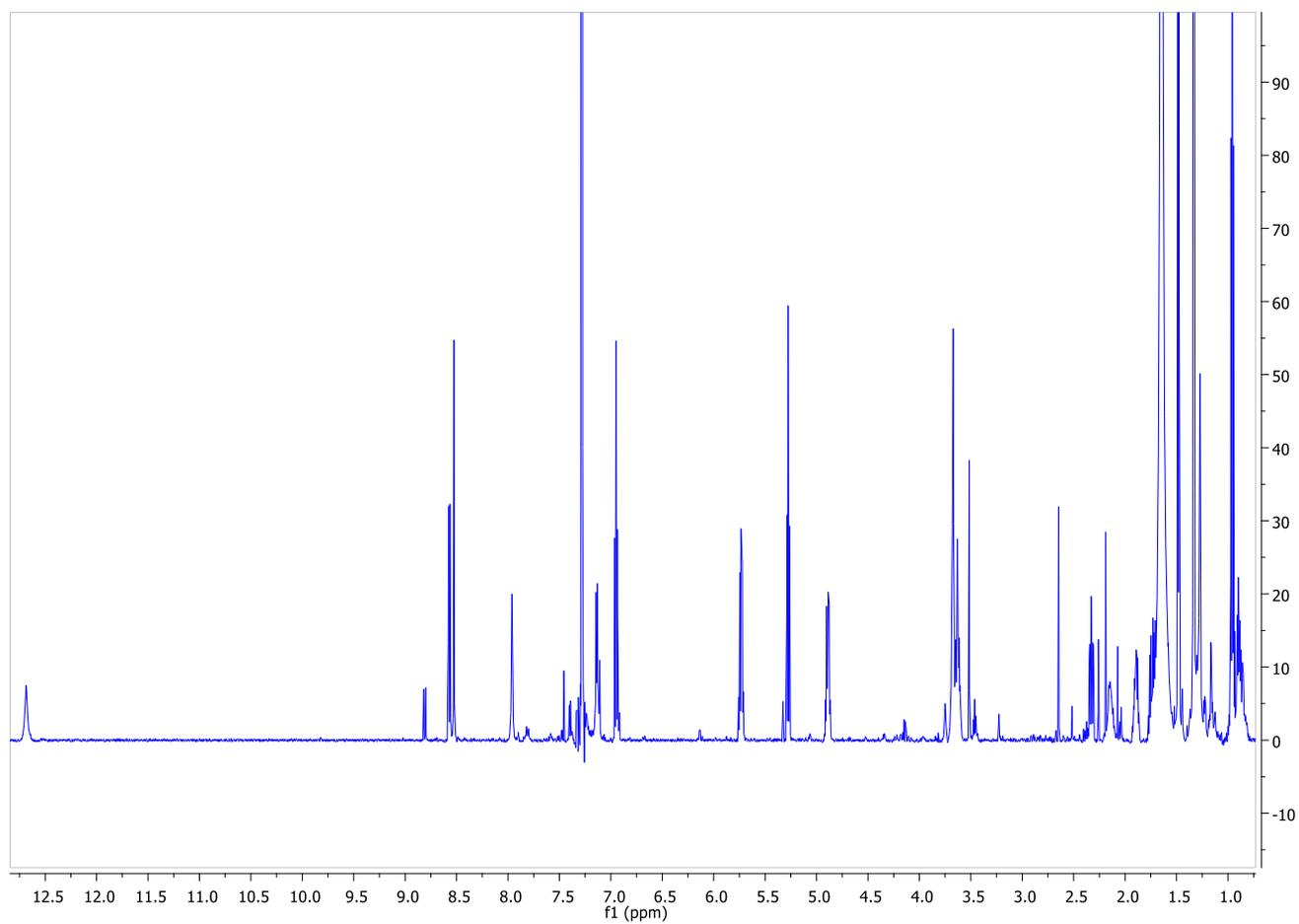
Anexo 34: COSY del compuesto 6.1 CDCl₃, (600 MHz)



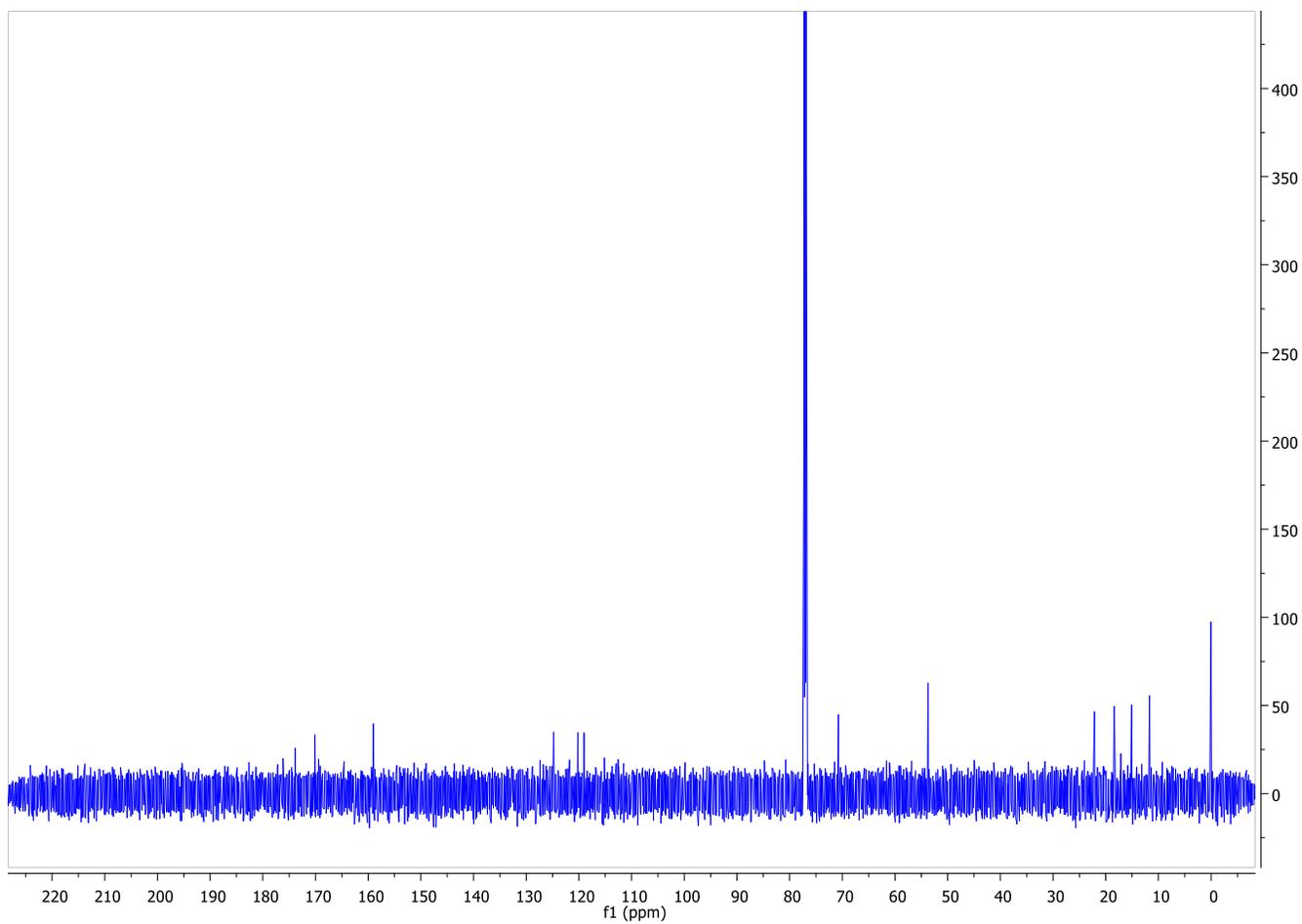
Anexo 35: HMBC del compuesto 6.1 CDCl₃, (600 MHz)



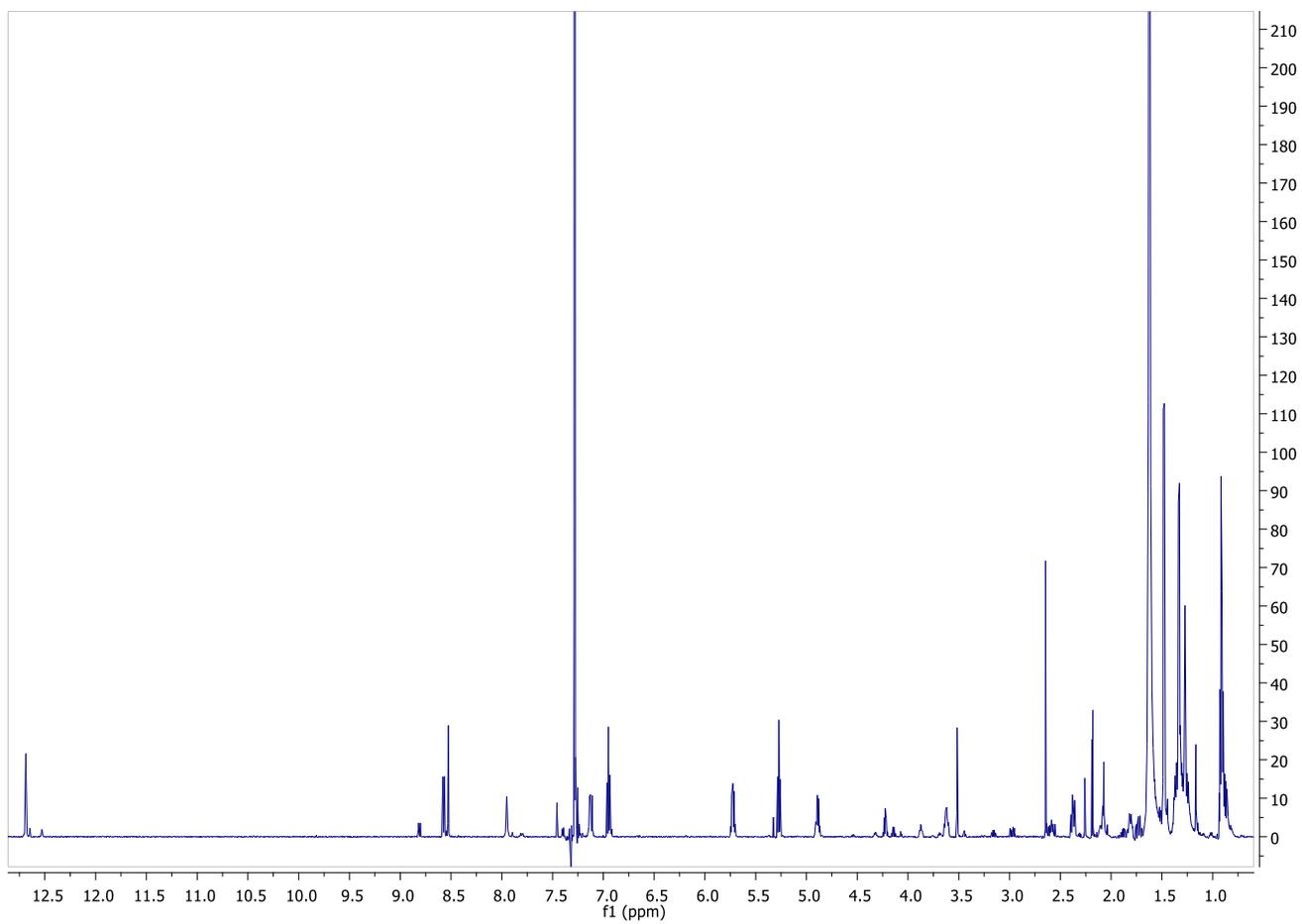
Anexo 36: RMN-¹H del compuesto 6.2 CDCl₃, (600 MHz)



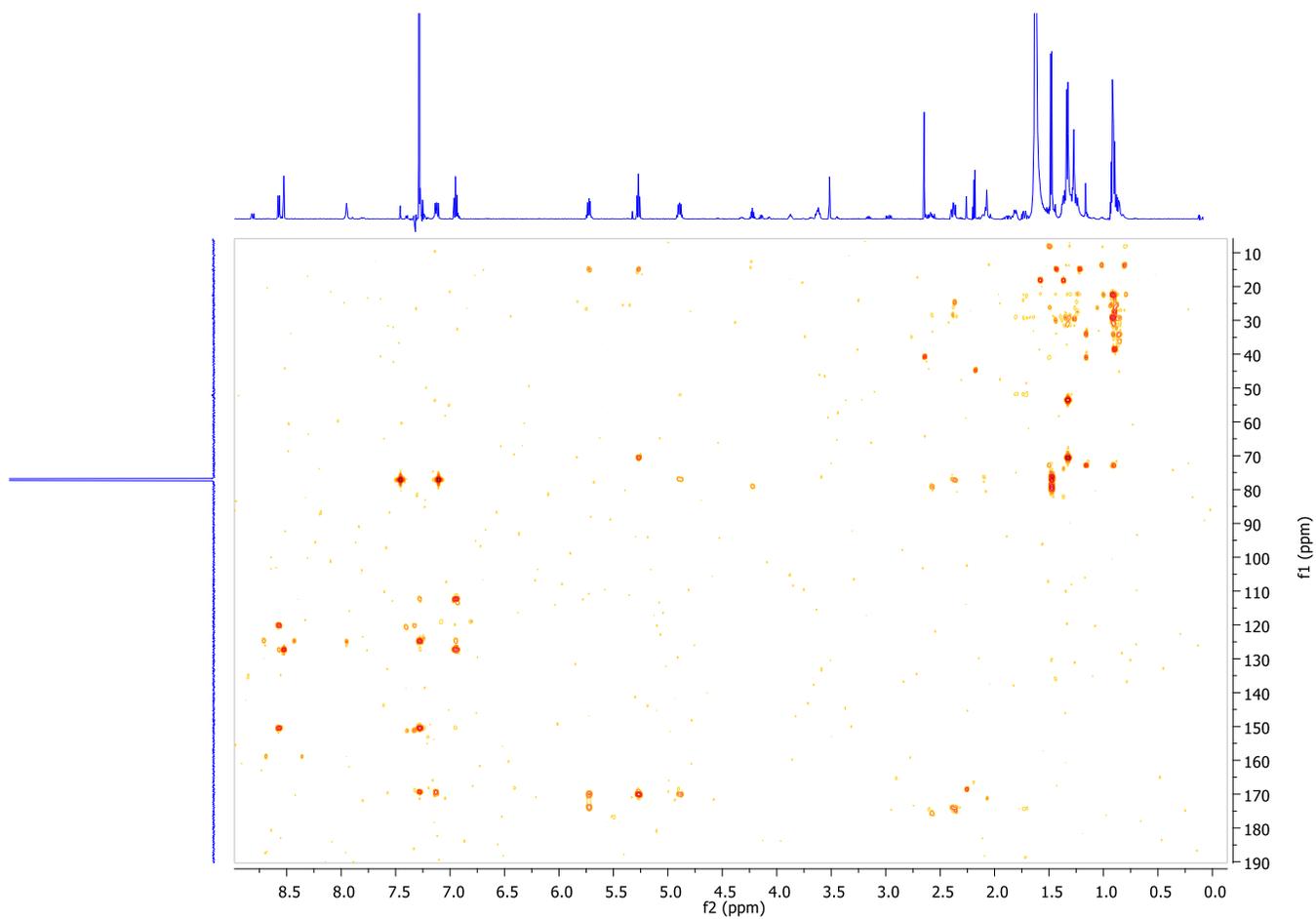
Anexo 37: RMN-¹³C del compuesto 6.2 CDCl₃, (150 MHz)



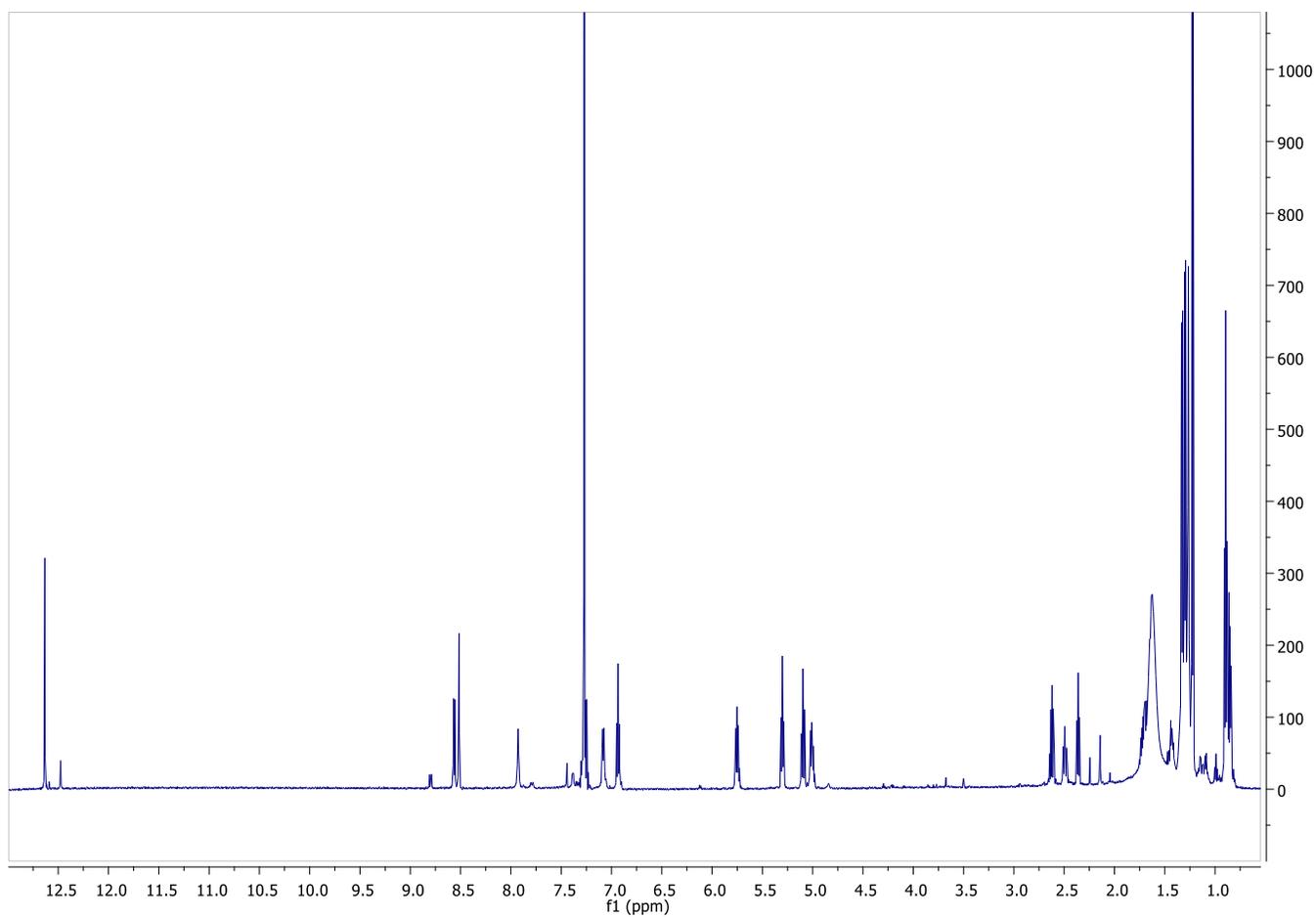
Anexo 38: RMN-¹H del compuesto 6.3 CDCl₃, (600 MHz)



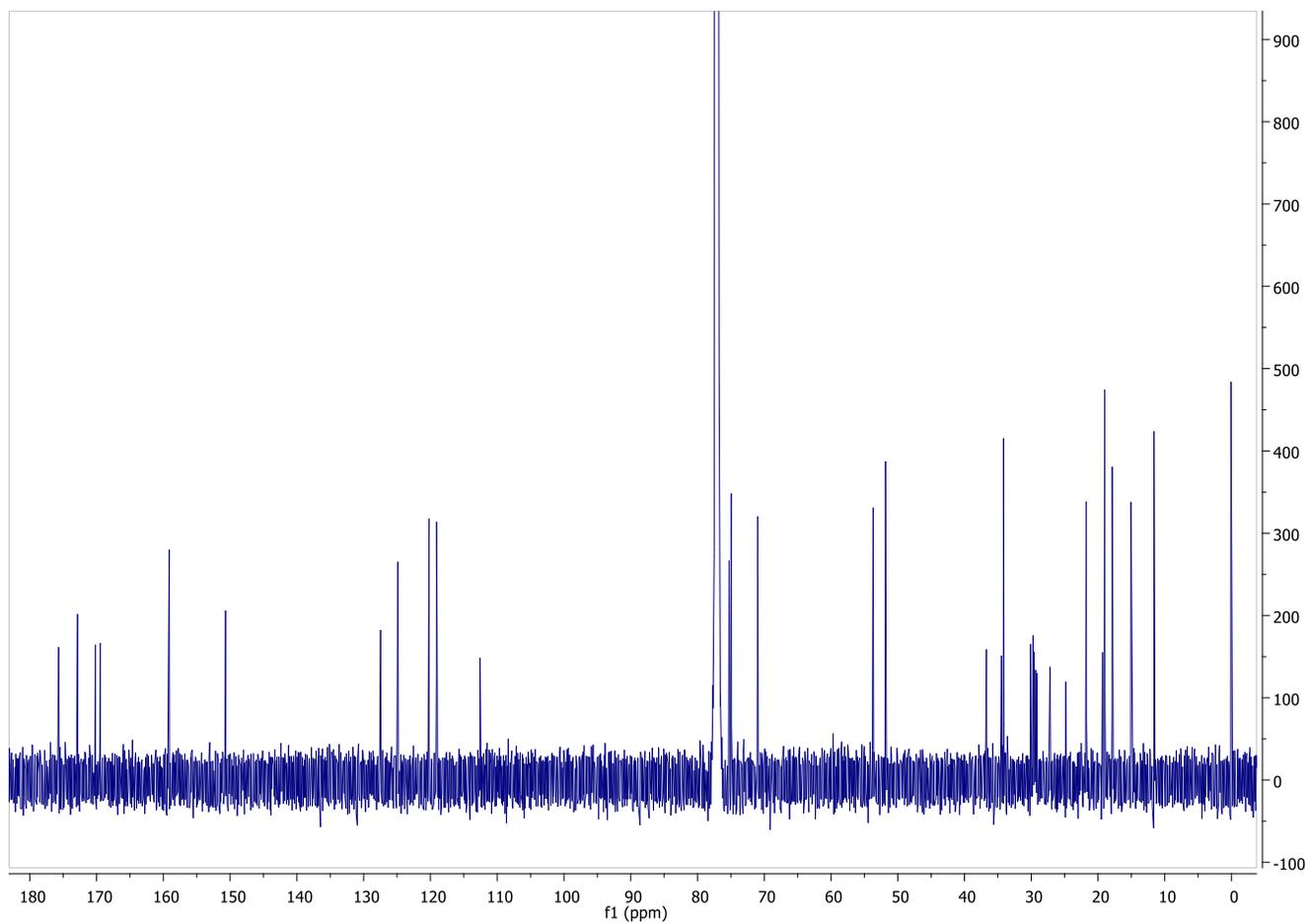
Anexo 39: HMBC del compuesto 6.3 CDCl₃, (600 MHz)



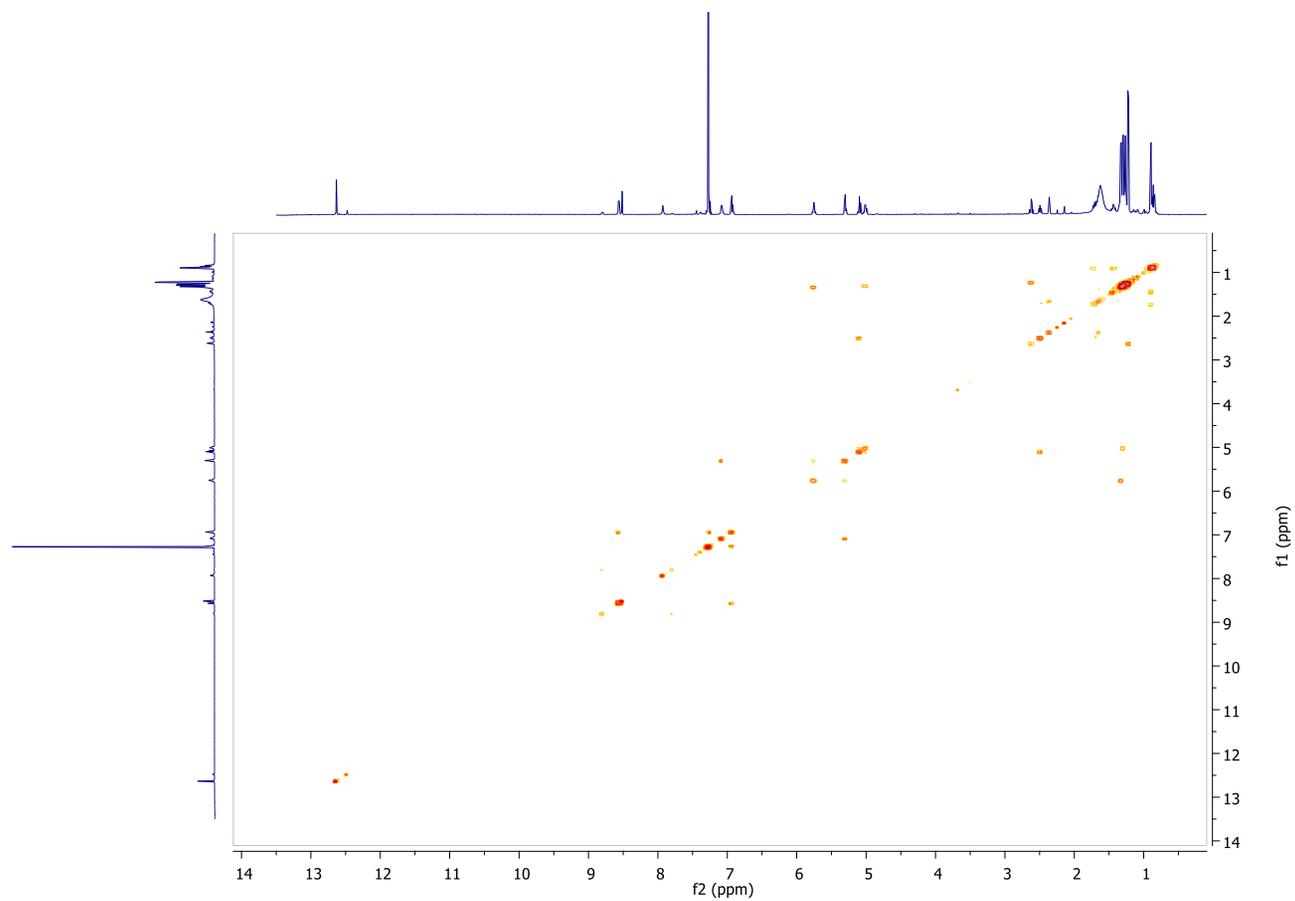
Anexo 40: RMN-¹H del compuesto 6.4 CDCl₃, (600 MHz)



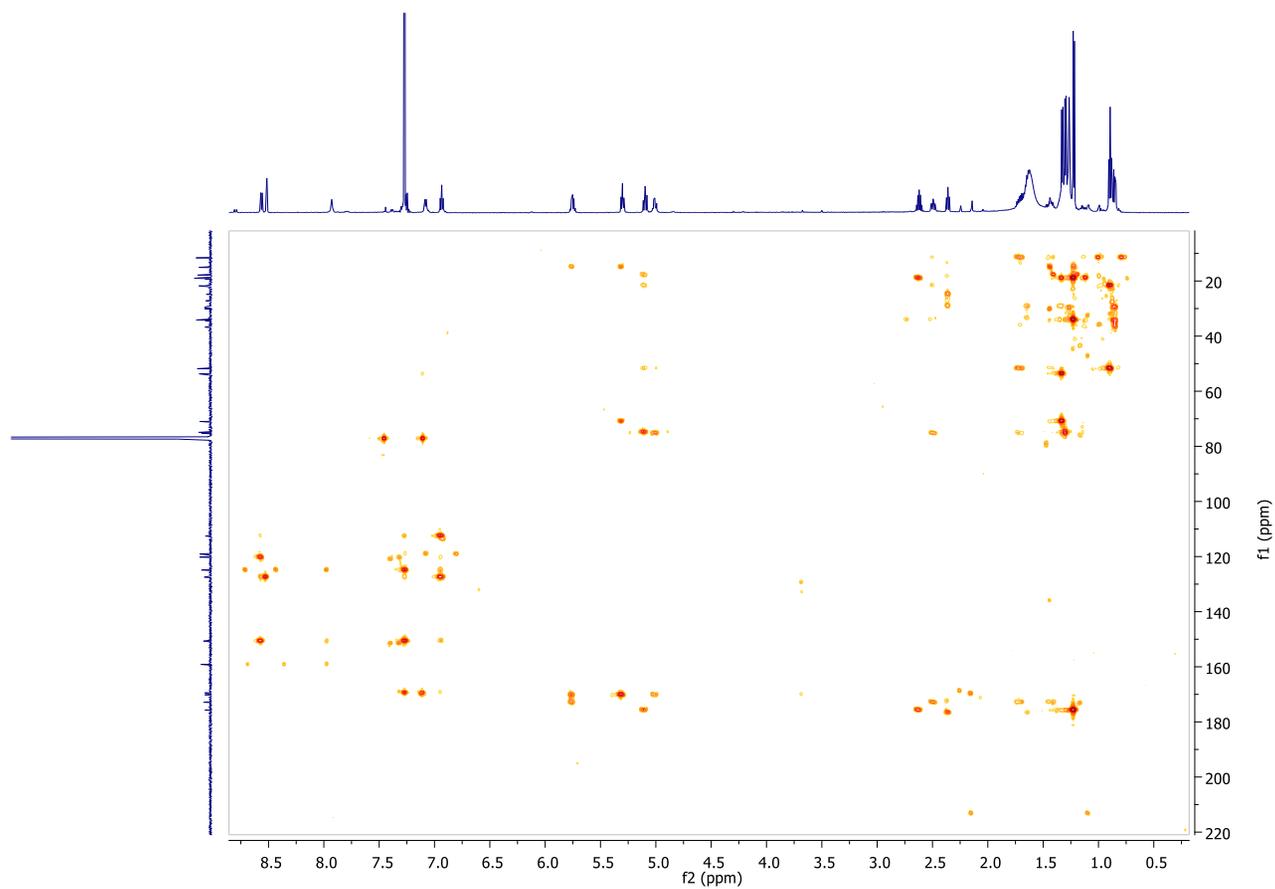
Anexo 41: RMN-¹³C del compuesto 6.4 CDCl₃, (150 MHz)



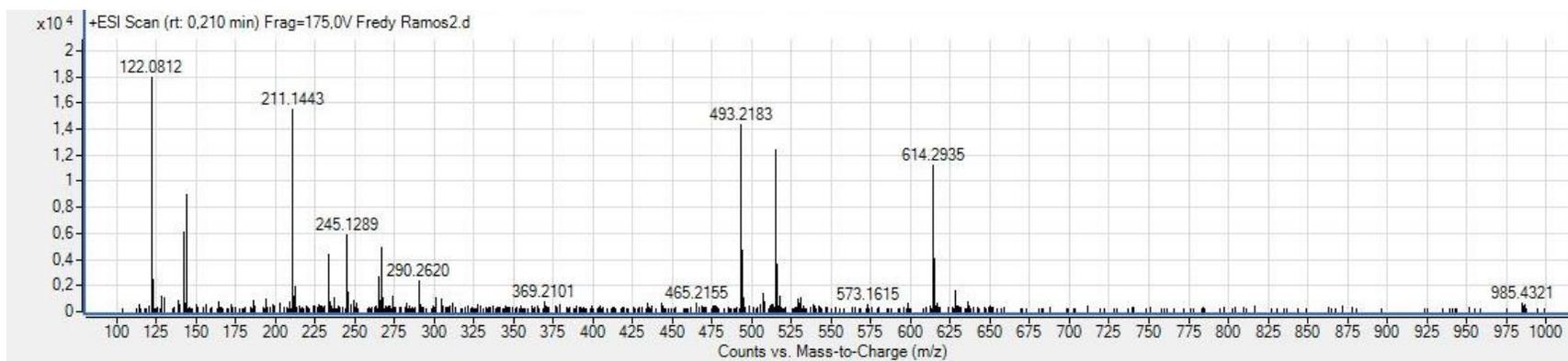
Anexo 42: COSY del compuesto 6.4 CDCl₃, (600 MHz)

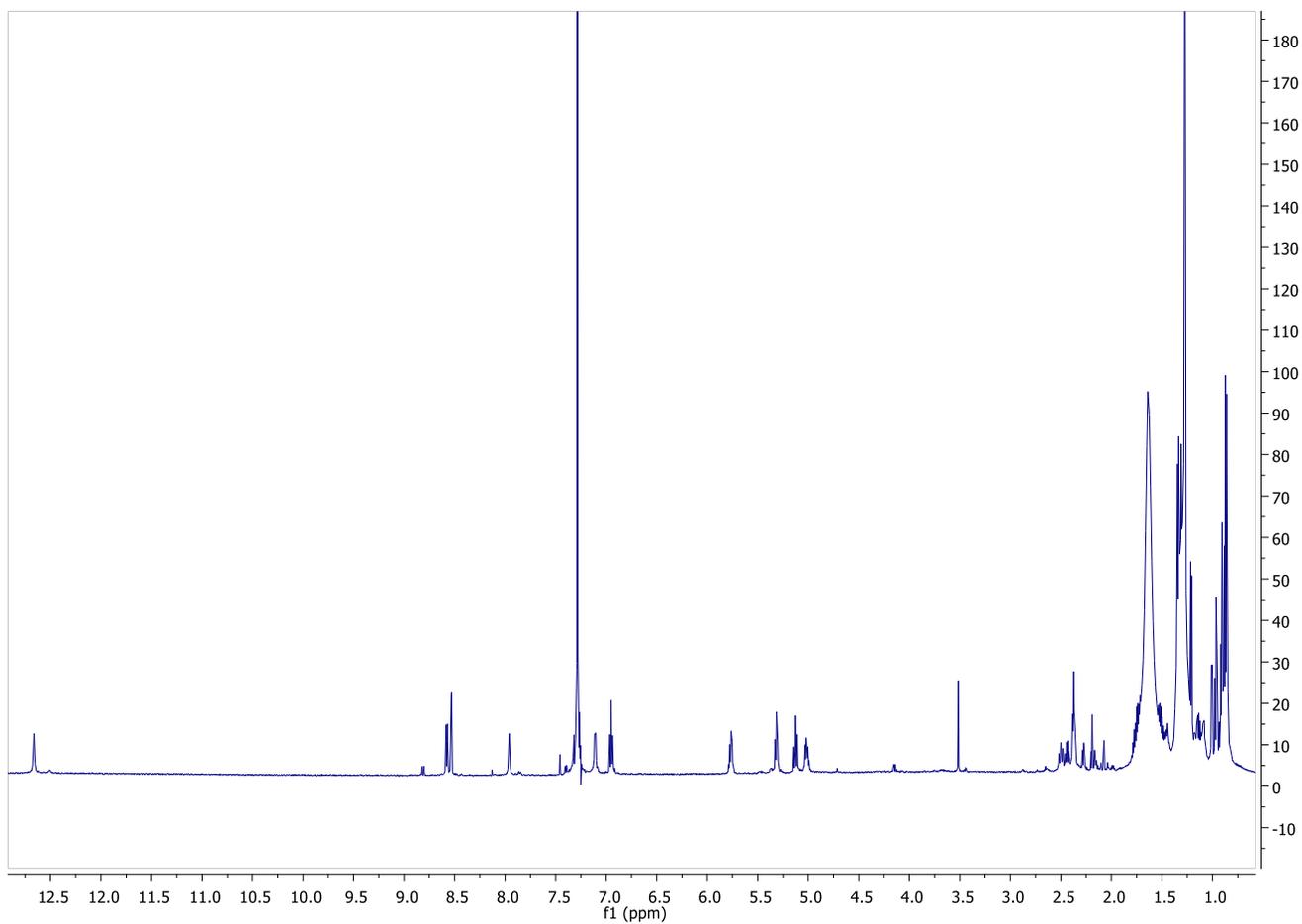


Anexo 43: HMBC del compuesto 6.4 CDCl₃, (600 MHz)

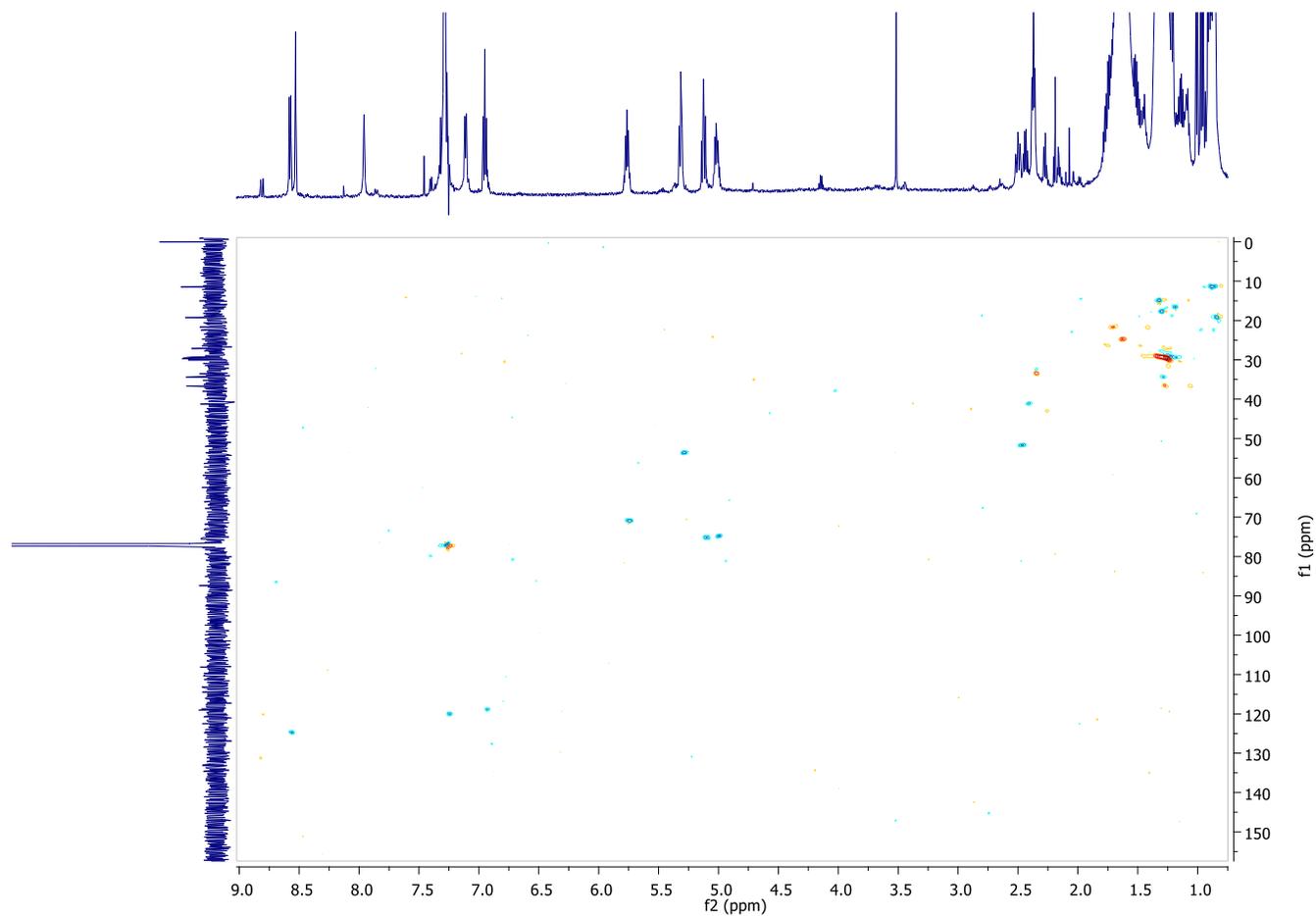


Anexo 44: EM del compuesto 6.5 CDCl₃, (600 MHz)

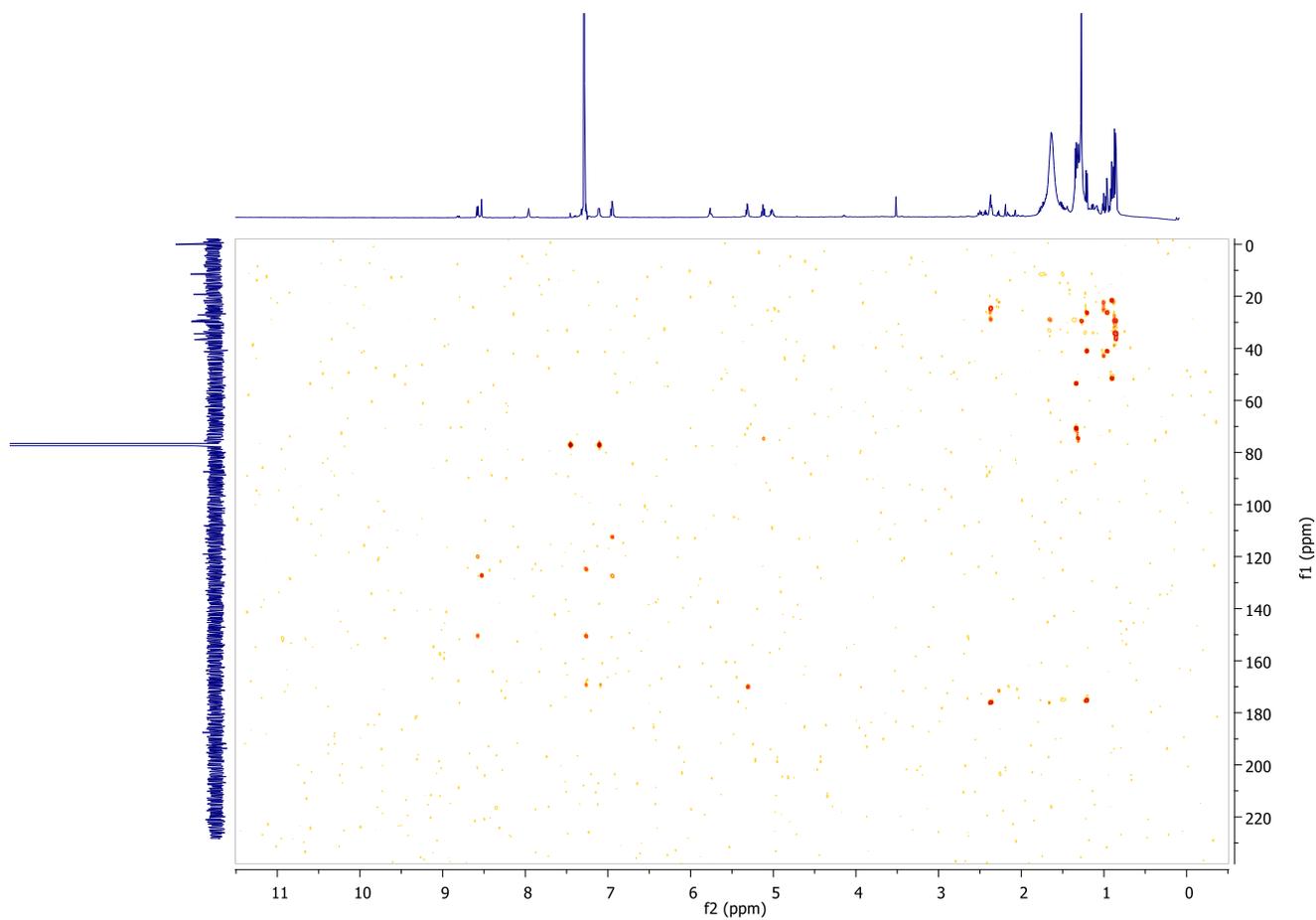


Anexo 46: RMN-¹H del compuesto 6.5 CDCl₃, (600 MHz)

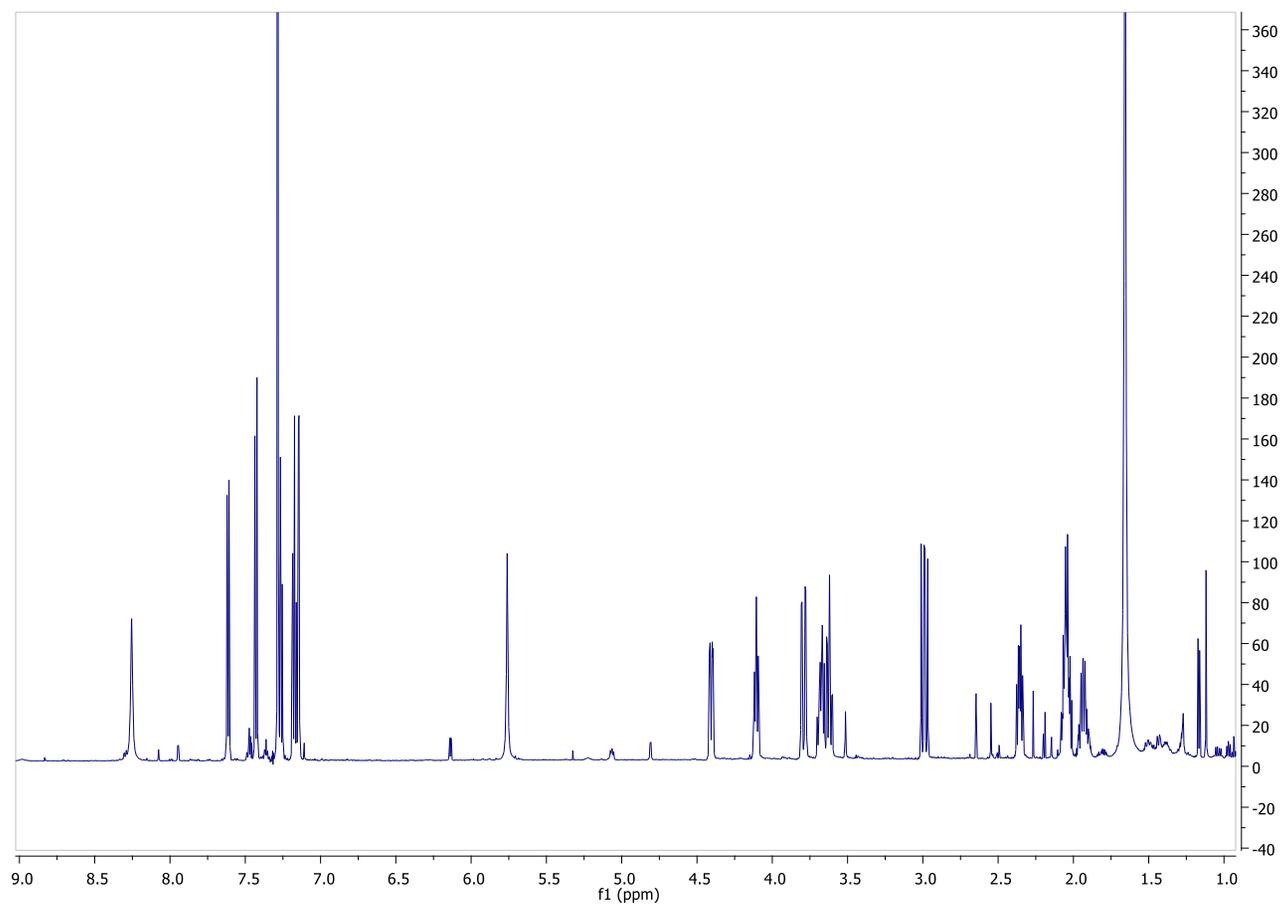
Anexo 46: HSQC del compuesto 6.5 CDCl₃, (600 MHz)



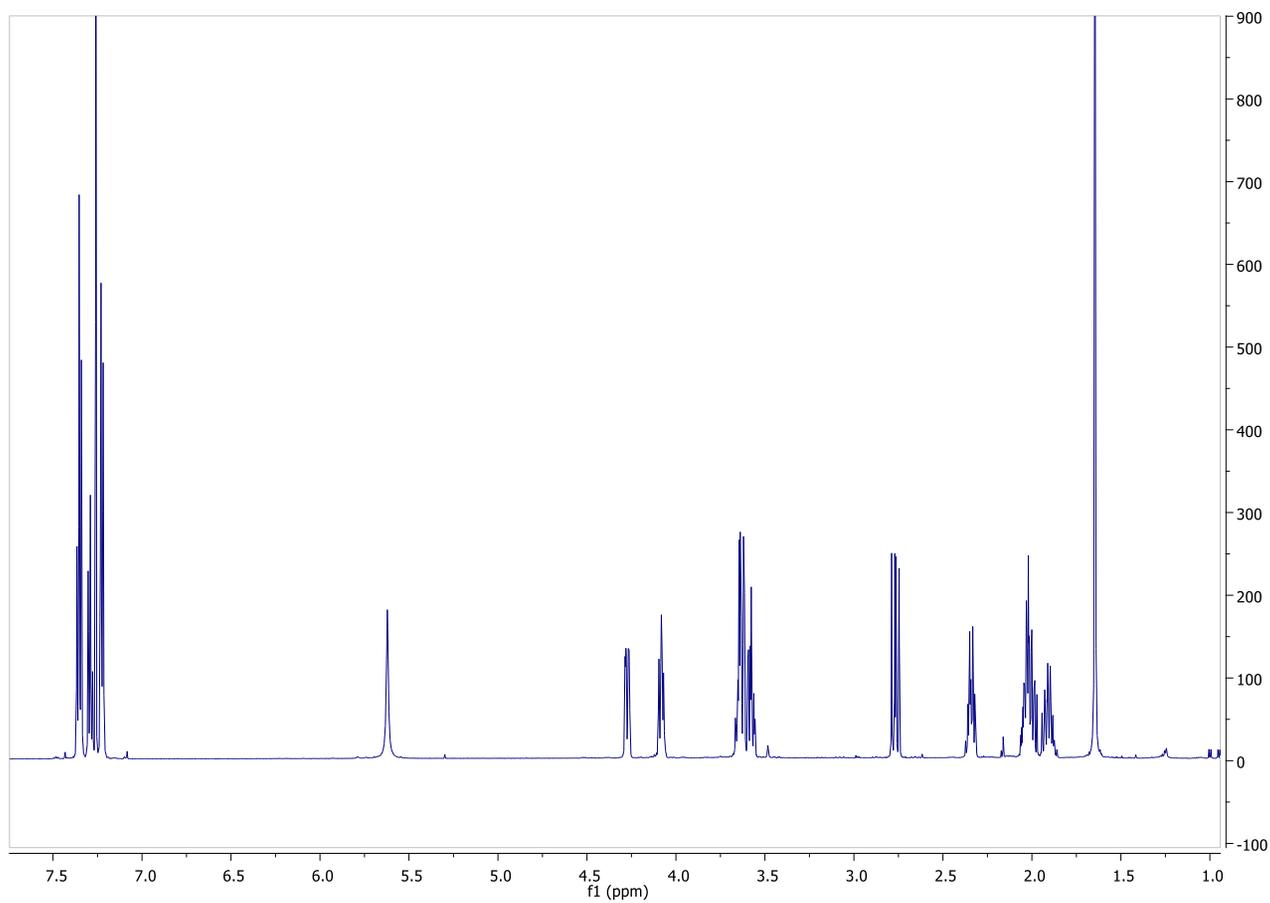
Anexo 47: HMBC del compuesto 6.5 CDCl₃, (600 MHz)



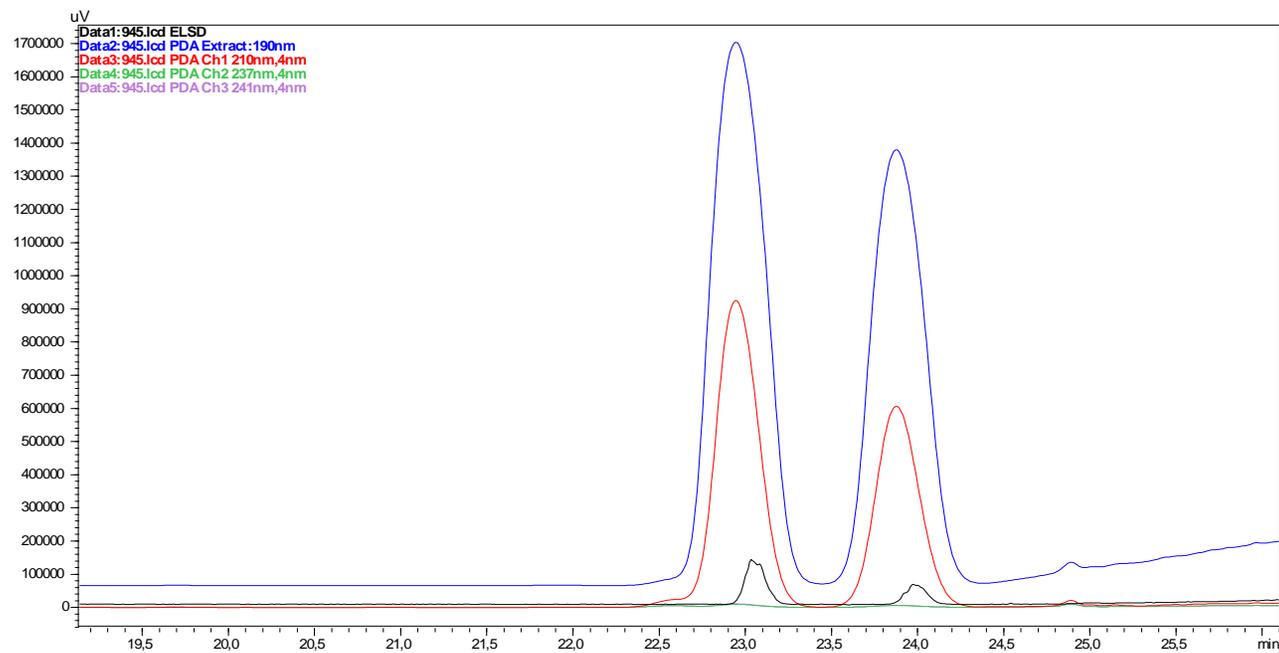
Anexo 48: RMN-¹H del compuesto 6.6 CDCl₃, (600 MHz)

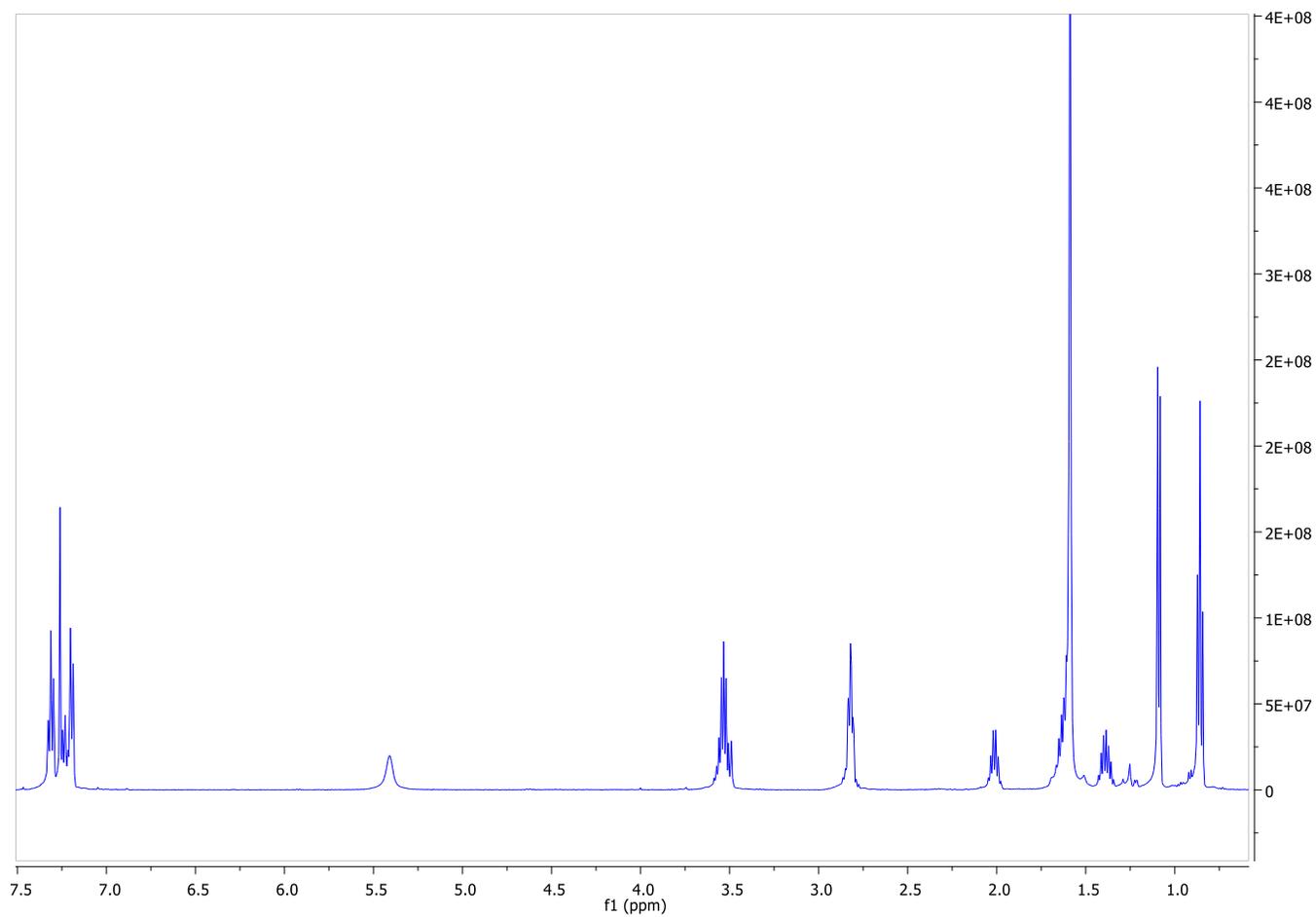


Anexo 49: RMN-¹H del compuesto 6.7 CDCl₃, (600 MHz)



Anexo 50: Separación por HPLC de los compuestos 7.1 y 7.2



Anexo 51: RMN-¹H del compuesto 7.1 (CDCl₃, 500 MHz)

Anexo 52: RMN-¹H del compuesto 7.2 (CDCl₃, 500 MHz)

