



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



Evaluación del crecimiento y actividad antibacteriana
de *Salinispora arenicola* bajo diferentes condiciones de cultivo

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS

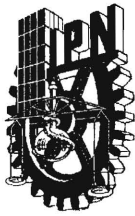
EN

MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA

JESSICA DOLORES ARRONA ORTIZ

LA PAZ, BCS, ENERO DEL 2018



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 28 del mes de Noviembre del 2018 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

“EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE
***Salinispora arenicola* BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO”**

Presentada por el alumno:

ARRONA

Apellido paterno

ORTIZ

materno

JESSICA DOLORES

nombre(s)

Con registro:

A	1	7	0	9	0	0
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

MAESTRIA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

DRA. CLAUDIA JUDITH HERNÁNDEZ GUERRERO
Directora de Tesis

DR. CÉSAR SALAZAR CARDONA FÉLIX
2º. Director de Tesis

DRA. CHRISTINE JOHANNA BAND SCHMIDT

DR. MAURICIO MUÑOZ OCHOA

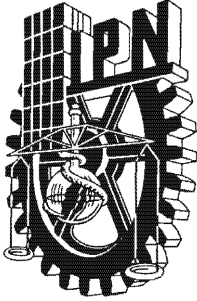
DRA. MARÍA MERCEDES CUETO PRIETO

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DR. VERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO



I.P.N.
CICIMAR
DIRECCIÓN



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 06 del mes de Diciembre del año 2018

El (la) que suscribe BIÓL. JESSICA DOLORES ARRONA ORTIZ Alumno (a) del Programa

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

con número de registro A170900 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DRA. CLAUDIA JUDITH HERNÁNDEZ GUERRERO Y DR. CÉSAR SALVADOR CARDONA FÉLIX

y cede los derechos del trabajo titulado:

"EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE

Salinispora arenicola BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la

siguiente dirección: jessica_arron@hotmail.com - claudia.hernandez.guerrero@gmail.com - ccardona.felix@gmail.com

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


BIÓL. JESSICA DOLORES ARRONA ORTIZ

Nombre y firma del alumno

La presente tesis se realizó en el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR) del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Claudia Judith Hernández Guerrero, y el Dr. César Salvador Cardona Félix, dentro de los proyectos “Producción de compuestos durante el crecimiento y esporulación de cepas del género *Salinispora* de Punta Arena de la Ventana, B.C.S., México”. SIP 20170434 y “Caracterización de compuestos con actividad antibacteriana producidos por *Salinispora* sp. frente a *Vibrio parahaemolyticus*”. SIP 20181803.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a la Beca de Estimulo Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI), así como a todos los apoyos otorgados para la realización de la estancia de Investigación.

A mis directores de Tesis, la Dra. Claudia Judith Hernández Guerrero y al Dr. César Salvador Cardona Félix, por el apoyo brindado para el desarrollo de este trabajo.

A los miembros del comité: Dra. Christine Johanna Band Schmidt, Dra. María Mercedes Cueto Prieto, Dr. Mauricio Muñoz Ochoa, por sus acertadas recomendaciones y sugerencias para el presente trabajo.

A la Dra. María Mercedes Cueto Prieto, por todo el apoyo, paciencia y sus enseñanzas durante mi estancia de investigación en el Instituto de Productos Naturales y Agrobiología.

Al Biól. Edgar Martínez por su constante apoyo y paciencia siempre.

DEDICATORIA

A mi familia, por su amor y apoyo constante.

INDICE	
GLOSARIO	I
ABREVIATURAS	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABLAS	V
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Condiciones de cultivo de <i>Salinispora</i>	4
2.2 La actividad antibacteriana del genero <i>Salinispora</i>	6
2.3 Compuestos con actividad antibacteriana	7
3. JUSTIFICACIÓN	9
4. HIPÓTESIS	10
5. OBJETIVOS	10
5.1 General	10
5.2 Particulares	10
6. MATERIALES Y MÉTODOS	11
6.1 Microorganismos	11
6.2 Condiciones de cultivo y determinación de la curva de crecimiento de <i>S. arenicola</i>	11
6.3 Adaptación de <i>S. arenicola</i> al estrés salino	12
6.4 Obtención de extractos orgánicos	12
6.5 Análisis preliminar del perfil de compuestos de extractos de <i>S. arenicola</i>	13
6.6 Bioensayos de actividad antimicrobiana	15
6.7 Concentración mínima inhibitoria de los extractos	15
7. RESULTADOS	18
7.1 Curva de crecimiento de <i>S. arenicola</i> en diferentes medios de cultivo	18
7.2 Caracterización de extractos orgánicos	21
7.3 Actividad antibacteriana de los extractos de <i>S. arenicola</i> frente a bacterias patógenas	23
7.4 Estructura química de los extractos con mayor actividad antibacteriana de <i>S. arenicola</i>	29
8. DISCUSIÓN	34

9. CONCLUSIONES	39
11. REFERENCIAS	40

GLOSARIO

Actividad biológica o bioactividad: Efecto benéfico o adverso de una sustancia sobre un organismo vivo.

Antagonismo: Interacción entre organismos o sustancias que causa la pérdida de actividad de cada uno de ellos.

Antibióticos: Sustancia química producida por un ser vivo o derivada sintéticamente que mata o inhibe el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles.

Bioactivos: Sustancias que tiene algún efecto sobre un organismo vivo, tejido o célula.

Cepa: En microbiología, conjunto de virus, bacterias u hongos que poseen la misma composición genética.

Gram positiva: Célula procariota cuya pared celular está compuesta básicamente por peptidoglicano y que carece de membrana externa.

Halo: Zona alrededor de un disco o área impregnada con la sustancia activa en la que no se produce crecimiento bacteriano.

Metabolito secundario: Compuesto orgánico sintetizado por el organismo que no tiene un rol directo en el crecimiento o reproducción de este, pero que pueden brindar ventaja competitiva.

Resistencia a los antimicrobianos: La resistencia a los antimicrobianos es el fenómeno por el cual un microorganismo deja de ser afectado por un antimicrobiano al que anteriormente era sensible. Es consecuencia de la capacidad de ciertos microorganismos (por ejemplo, bacterias y virus) de neutralizar el efecto de los medicamentos, como los antibióticos. La resistencia surge por la mutación del microorganismo o por la adquisición del gen de resistencia.

ABREVIATURAS

ATCC: American Type Culture Collection

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CCF: Cromatografía en capa fina

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

DCM: Diclorometano

DMSO: Dimetilsulfóxido

EtOAc: Acetato de etilo

EtOH: Etanol

GNPS: The Global Natural Products Social Molecular Networking

GYM: Glucosa levadura y malta

MS: Espectrometría de masas

RMN: Resonancia magnética nuclear

Rf: Factor de retención

SYP: Almidón levadura y peptona

UFC: Unidades formadoras de colonias

VPC: Volumen de paquete celular

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Bioensayo de evaluación de la mínima concentración inhibitoria (CMI) en microplaca de los extractos A) GYM-21 días/2.5%. B) SYP-21 días/4.5%. Diluciones (A) ($\mu\text{g/ml}$): (1): 50; (2): 25; (3): 12.5; (4): 6.25; (5): 1.5. Diluciones (B) ($\mu\text{g/ml}$): (1): 200; (2): 100; (3): 50; (4): 25; (5): 12.5. Cna: control de crecimiento microbiano *S. aureus*. Cne: control de crecimiento microbiano *S. epidermidis*. Cp: control positivo de inhibición por gentamicina (10 $\mu\text{g/ml}$).....**16**
- Figura 2.** Morfología de *Salinispora arenicola* cepa PA-Sa-33'-2.....**18**
- Figura 3.** Curva de crecimiento de *S. arenicola*, cultivada en medio GYM a diferentes salinidades 2.5, 3.5 y 4.5%.....**19**
- Figura 4.** Curva de crecimiento de *S. arenicola* cultivada en medio SYP a diferentes salinidades 2.5, 3.5 y 4.5%.....**20**
- Figura 5.** Efecto de dos medios de cultivo y diferentes salinidades en el crecimiento de *S. arenicola* a los 43 días de cultivo. Valores promedio y desviación estándar.....**20**
- Figura 6.** Cromatografía en capa fina de los extractos de *S. arenicola*, en diferentes días de cultivo, tres salinidades (2.5% en azul, 3.5% en rojo y 4.5% en verde) y dos medios de cultivo, (A) GYM y (B) SYP. R_f = Factor de retención.....**22**
- Figura 7.** Actividad antibacteriana de los extractos de *S. arenicola* obtenidos en (A) medio GYM y (B) medio SYP bajo diferentes condiciones de cultivo frente a *S. aureus*, a una concentración de 100 μg . Valores promedios y desviación estándar.....**24**
- Figura 8.** Actividad antibacteriana de los extractos de *S. arenicola* obtenidos en (A) medio GYM y (B) medio SYP bajo diferentes condiciones de cultivo frente a *S. aureus*, a una concentración de 250 μg . Valores promedios y desviación estándar.....**25**
- Figura 9.** Actividad antibacteriana de los extractos de *S. arenicola* obtenidos en (A) medio GYM y (B) medio SYP bajo diferentes condiciones de cultivo frente a *S.*

epidermidis, a una concentración de 100 µg. Valores promedios y desviación estándar.....**26**

Figura 10. Actividad antibacteriana de los extractos de *S. arenicola* obtenidos en (A) medio GYM y (B) medio SYP bajo diferentes condiciones de cultivo frente a *S. epidermidis*, a una concentración de 250 µg. Valores promedios y desviación estándar.....**27**

Figura 11. Halos de inhibición de los extractos más activos de *S. arenicola*. Medio GYM (2.5 %) y medio SYP (4.5 %) frente a A) *Staphylococcus aureus* y B) *S. epidermidis*.....**28**

Figura 12. Espectro de ¹H-RMN de la fracción de DCM del extracto GYM- salinidad 2.5% en CDCl₃ donde se observan desplazamientos químicos característicos del compuesto ácido fenilacético (1)**31**

Figura 13. Espectro de ¹H-RMN de la fracción SYP- salinidad 4.5%/H₂O en CD₃OD donde se observan desplazamientos químicos característicos del compuesto uracilo (2).....**33**

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Metabolitos secundarios reportados para el género <i>Salinispora</i> spp. Tomado y modificado de Jensen <i>et al.</i> , 2015.....	8
Tabla 2. Reveladores para análisis fitoquímico.....	13
Tabla 3. Obtención de extractos de <i>S. arenicola</i> bajo diferentes condiciones de cultivo.....	21
Tabla 4. Susceptibilidad de <i>S. aureus</i> (ATCCBAA-42) y <i>S. epidermidis</i> (ATCC-12228), a diversos antibióticos.....	23
Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos más activos de <i>Salinispora arenicola</i>	28
Tabla 6. Resultados del análisis preliminar del perfil de metabolitos de los extractos de <i>S. arenicola</i> , bajo las condiciones con mayor actividad antibacteriana.....	29
Tabla 7. Fraccionamiento de los extractos de 21 días de cultivo en diferentes condiciones.....	30
Tabla 8. Datos de desplazamiento de ¹ H RMN de ácido fenilacético en CDCl ₃ . Valores de referencia de acuerdo con los datos espectroscópicos de Leggio <i>et al.</i> 2012.....	31
Tabla 9. Datos de desplazamiento de ¹ H RMN de uracilo en CD ₃ OD. Valores de referencia de acuerdo con los datos espectroscópicos de Rathnayake <i>et al.</i> 2018.....	32

RESUMEN

Dentro del grupo de las actinobacterias, el género *Salinispora* presenta interés biotecnológico al ser una fuente importante de antibióticos frente a cepas patógenas de importancia clínica. Actualmente existe una problemática en el sector salud debido a la resistencia de microorganismos patógenos a los antibióticos actuales, lo que motiva la búsqueda de bacterias productoras de metabolitos con potencial antibacteriano. Una alternativa para que la producción de compuestos antibacterianos a partir de microorganismos sea más eficiente, implica la búsqueda de diferentes condiciones de cultivo (variaciones en salinidad, nutrientes, entre otros). En el caso del género *Salinispora*, al ser una bacteria marina obligada, la salinidad es un factor crucial para su crecimiento y por otro lado, se ha observado que a lo largo de su ciclo de vida, la producción de compuestos se modifica. Por lo que el presente trabajo tiene como objetivo, evaluar el efecto de diferentes condiciones de cultivo de *S. arenicola* (cepa PA-Sa-33'-2) en el crecimiento y la actividad antibacteriana frente a bacterias patógenas. Para el desarrollo del trabajo se evaluaron diferentes condiciones, dos medios de cultivo GYM y SYP que difieren en la fuente de carbono (glucosa, almidón), nitrógeno (malta y peptona), así como diferentes concentraciones de salinidad (2.5, 3.5 y 4.5 %) y tiempos de cultivo (7, 14, 21, 28 y 35 días). Los resultados mostraron variaciones tanto en el crecimiento como en la actividad antibacteriana dependiendo de la condición evaluada. El mayor crecimiento de *S. arenicola* se obtuvo con el medio GYM (Glucosa, levadura, malta) a una salinidad de 3.5% con fases de desarrollo bien definidas, pero baja actividad frente a las bacterias patógenas. Mientras que cuando las condiciones no favorecieron el crecimiento de *S. arenicola*, se incrementó la actividad antibacteriana. De tal manera que las condiciones de crecimiento en GYM con 2.5% de salinidad y SYP con 4.5% propiciaron la mayor actividad (MIC=1.52 µg/ml) con un tiempo de cultivo de 21 días. El análisis preliminar de las fracciones de los extractos más activos mostró por de-replicación la presencia de los compuestos uracilo y ácido fenilacético.

Palabras clave: Estrés salino, Extractos, *Salinispora*, *Staphylococcus*

ABSTRACT

Within the group of actinobacteria, the genus *Salinispora* has a biotechnological interest as it is an important source of antibiotics against pathogenic strains of clinical importance. Currently there is a problem in the health sector due to the resistance of pathogenic microorganisms to current antibiotics, which motivates the search for bacteria that produce metabolites with antibacterial potential. An alternative for the production of antibacterial compounds from microorganisms is more efficient, involves the search of different culture conditions (variations in salinity, nutrients, among others). In the case of the genus *Salinispora*, being an obligate marine bacterium, salinity is a crucial factor for its growth and on the other hand, it has been observed that throughout its life cycle, the production of compounds is modified. Therefore, the objective of this work is to evaluate the effect of different culture conditions of *S. arenicola* (strain PA-Sa-33'-2) on the growth and antibacterial activity against pathogenic bacteria. For the development of the work, different conditions were evaluated, two GYM and SYP culture media that differ in the carbon source (glucose, starch), nitrogen (malt and peptone), as well as different salinity concentration (2.5, 3.5 and 4.5%).) and culture times (7, 14, 21, 28 and 35 days). The results showed variations in both growth and antibacterial activity depending on the condition evaluated. The highest growth of *S. arenicola* was obtained with GYM medium (Glucose, yeast, malt) at a salinity of 3.5% with well-defined development phases, but low activity against pathogenic bacteria. While when conditions did not favor the growth of *S. arenicola*, antibacterial activity increased. In such a way that the conditions of growth in GYM with 2.5% of salinity and SYP with 4.5% led to the highest activity (MIC = 1.52 µg/ml) with a culture time of 21 days. The preliminary analysis of the fractions of the most active extracts showed by de-replication the presence of the compounds uracil and phenylacetic acid.

Key words: Extracts, Saline stress, *Salinispora*, *Staphylococcus*

1. INTRODUCCIÓN

Las actinobacterias se caracterizan por ser un grupo de microorganismos prometedores como productores potenciales de compuestos bioactivos, tales como antibióticos, antitumorales e inmunosupresores (Íñiguez-Martínez *et al.*, 2016). Las capacidades metabólicas y fisiológicas que poseen les permiten no sólo habitar ambientes extremos, sino también producir compuestos con diversas actividades farmacológicas (Jensen & Fenical, 1994; Magarvey *et al.*, 2004; Fenical & Jensen, 2007; León *et al.*, 2007).

Los miembros del género *Salinispora* son actinobacterias marinas obligadas, aisladas de sedimentos marinos tropicales y subtropicales. La secuenciación de algunos genomas de este género mostró que un amplio porcentaje es utilizado para el proceso de biosíntesis de metabolitos secundarios (Duncan *et al.*, 2015; Maldonado *et al.*, 2005). De las tres especies descritas para este género, *Salinispora arenicola*, es la más abundante y ampliamente distribuida (Mincer *et al.*, 2002; Maldonado *et al.*, 2009).

A partir de cepas de *S. arenicola* se han identificado una diversidad de compuestos, incluyendo al grupo de potentes antibióticos de la clase de la rifamicina, compuestos actualmente comercializados (Bose *et al.*, 2014). Con la finalidad de incrementar u optimizar la producción de metabolitos bioactivos, diversos trabajos han modificado el efecto que tienen las condiciones de cultivo y tiempos de cosecha (Ma *et al.*, 2008; Ng *et al.*, 2014). Para el caso específico de *S. arenicola*, al ser una especie marina obligada, requiere de un medio salino para su desarrollo. Modificaciones en la concentración de la salinidad durante el cultivo, originan cambios en la producción de antibióticos (Ng *et al.*, 2014). Otro aspecto a considera, es la relación entre el ciclo de vida de la especie y la producción de metabolitos secundarios. En cepas de *S. arenicola* asociadas a esponjas, se observó que la mayor producción de compuestos del tipo de las rifamicinas se producía después de 32 días de cultivo (Ng *et al.*, 2013).

Para la optimización del medio de cultivo en la producción de antibióticos, los nutrientes son un factor importante de analizar. En actinobacterias, dos tipos de medio ampliamente utilizados son el: SYP, que contiene almidón, levadura y peptona (Ng *et al.*, 2013; Ng *et al.*, 2014) y el GYM, formulado con glucosa, extracto de levadura y extracto de malta (Schneemann *et al.*, 2010; Kurtböke *et al.*, 2015).

Estudios previos de la actividad antibacteriana de cepas de *S. arenicola* aisladas de sedimento de Punta Arena de La Ventana, B.C.S., dentro del Golfo de California, mostraron actividad antibacteriana (datos sin publicar). Por lo que la finalidad del presente trabajo fue determinar las condiciones de cultivo (salinidad, nutrientes y tiempo de cultivo) que permitan el crecimiento de la cepa de *S. arenicola* PA-Sa-33'-2, e incrementen su actividad antibacteriana frente a cepas resistentes de *S. epidermidis* y *S. aureus*, unos de los patógenos con mayor importancia epidemiológica en hospitales debido a las altas tasas de morbilidad y mortalidad que presentan (Baños *et al.*, 2015).

2. ANTECEDENTES

2.1 Condiciones de cultivo de *Salinispora*

En experimentos realizados para la optimización de medios de cultivo utilizando glucosa como fuente de carbono se ha observado que se obtiene una mayor biomasa en presencia de concentraciones bajas de esta fuente de carbono (Ferreira- Torres *et al.*, 2012). Por otra parte, en presencia de altas cantidades de glucosa o moléculas complejas, se puede observar una disminución en la biomasa, lo cual posiblemente se deba a una represión catabólica (Van Keulen *et al.*, 2011).

Ferreira-Torres (2012) observó diferencias significativas al determinar la fuente de carbono adecuada para la mayor producción de biomasa en la actinobacteria *Thermobifida* sp. MCR24, al comparar glucosa, galactosa, manosa, inositol,

sorbitol, adonitol, dulcitol, manitol, maltosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa, lactosa, arabinosa, xilosa, ramnosa, fructosa, citrato, urea y esculina, obteniendo la máxima producción con sacarosa como fuente de carbono, y este sustrato al ser un dímero formado por glucosa y fructosa, requiere de la actividad enzimática para su hidrólisis para que se puedan asimilar los monómeros. Por otro lado, en la producción de biomasa de *Streptomyces sp.* MCR9 se encontró que la celobiosa como fuente de carbono registró la máxima producción de biomasa (Ferreira-Torres *et al.*, 2012).

En el aislamiento de actinobacterias marinas en Bahía de los Santos, Baja California Sur, México, se utilizó el medio GYM (glucosa- extracto de levadura y malta). Esta fuente de nutrientes favoreció el crecimiento de sesenta y cinco aislamientos que se asemejan a las características morfológicas típicas de los miembros de la familia Micromonosporaceae, a saber, los géneros *Micromonospora*, *Verrucosipora* y *Salinispora* (Becerril-Espinosa *et al.*, 2013).

Por otro lado, se han realizado trabajos enfocados en la optimización del cultivo de *Salinispora*, Tsueng & Lam en el 2010, en donde reportaron que las tres especies de *Salinispora*, *S. arenicola*, *S. tropica* y *S. pacifica*, requieren magnesio y calcio para su crecimiento. *S. pacifica* presentó el requisito de crecimiento más estricto para estos iones. La interacción entre estos dos iones mejoró el crecimiento de *Salinispora*. Se demostró que el aporte de sodio para propiciar el crecimiento de *Salinispora* no fue exclusivo, ya que las tres especies de *Salinispora* pueden usar potasio o litio como reemplazo del sodio para su crecimiento. El litio a pesar de que puede sustituir al sodio es más tóxico para *S. arenicola* que para *S. tropica* y *S. pacifica* (Tsueng & Lam, 2010). Usando medios basados en cloruro de sodio y de litio, resultó que *Salinispora* tiene un requisito de crecimiento para iones divalentes como magnesio y calcio. *S. arenicola* tiene requerimientos fuerza iónica menor que *S. tropica* y *S. pacifica*.

Otros estudios se han enfocado en la variación de la fuente de carbono y nitrógeno, así como en la respuesta al estrés salino en los medios de cultivo para el crecimiento de *Salinispora*. Recientemente se ha investigado el efecto de la salinidad en relación directa con el crecimiento de *S. arenicola*. Ng *et al.* (2014)

evaluaron el efecto de la salinidad en la producción de biomasa en *S. arenicola*, utilizando sal marina artificial, NaCl y K⁺ en medio SYP, determinaron el VPC después de 43 días de cultivo en cada una de las condiciones, concluyendo que el crecimiento máximo se presentó en un estrés salino con 1% NaCl con un 3.25% VPC

2.2 La actividad antibacteriana del genero *Salinispora*

Las cepas del género *Salinispora* han mostrado actividad antitumoral y antibiótica (Fenical & Jensen, 2007). Se ha descrito el cultivo de más de 100 cepas de *Salinispora* spp. reportando que más del 80% inhibieron el crecimiento de células tumorales humanas, y que el 35% mostró propiedades antimicrobianas hacia patógenos humanos, como *Candida albicans* resistente a anfotericina y *Eterococcus faecium* resistente a vancomicina. Por lo que las cepas de *Salinispora* resulta ser una fuente de nuevas entidades químicas (Mincer *et al.*, 2002). Asolkar *et al.* (2010) probaron extractos crudos de *Salinispora*, mostrando actividad contra *Staphylococcus* resistente a la rifampicina y a la metilina.

Se han evaluado actinobacterias de sedimentos marinos del Golfo de California, como fuentes de cepas bioactivas potenciales. Se aislaron 235 cepas de actinobacterias de los sedimentos de Bahía Concepción y Bahía de Los Ángeles, México, con base en su morfología y secuenciación del gen 16S del ARNr. Las cepas se clasificaron como *Streptomyces*, *Micromonospora* y *Salinispora*, se obtuvieron extractos orgánicos de los cuales tres mostraron actividad antibiótica contra *Staphylococcus aureus*, que es resistente a la metilina (Torres-Beltrán *et al.*, 2012). De acuerdo con el análisis filogenético de 136 cepas aisladas de sedimento colectadas en el Golfo de California se identificaron ocho géneros: *Actinomadura*, *Salinispora*, *Micromonospora*, *Nocardiopsis*, *Nonomuraea*, *Saccharomonospora*, *Streptomyces* y *Verrucospora*, de estas cepas se obtuvieron 302 extractos orgánicos de los cuales el 65.23% resultó con actividad antibiótica contra *Pseudomona aeuroginosa* y *Proteus vulgaris* (Becerril-Espinosa, 2011; Becerril-Espinosa *et al.*, 2013).

En un estudio realizado por Cardoso y colaboradores (2015) en el Parque Nacional Bahía de Loreto en el Golfo de California, encontraron actividad citotóxica en el 40% de las cepas probadas mediante ensayos *in vitro*. Mientras que de la actividad antibacteriana en el 71% de las cepas evaluadas frente a *P.aeruginosa*, *Proteus vulgaris* y *Staphylococcus* resistente a la rifampicina y a la meticilina.

2.3 Compuestos con actividad antibacteriana

En un esfuerzo por descubrir nuevos antibióticos, se han logrado identificar y aislar nuevos compuestos bioactivos como agentes antibacterianos frente a cepas de patógenos resistentes, como es el caso de salinisporamicina y arenimicina (Matsuda *et al.*, 2009; Asolkar *et al.*, 2010). Por otro lado, Arenicolido A fue identificado y probado en un ensayo antimicrobiano utilizando *S. aureus* multidrogo resistente y *E. faecium* resistente a la vancomicina (Williams *et al.* 2007). Los metabolitos secundarios reportados para el género *Salinispora* se presentan en la **Tabla 1**. La arenimicina es un antibiótico nuevo que pertenece a la clase de benzo(α) naftaleno-quinona producida por *S. arenicola* (Asolkar *et al.* 2010), tiene actividad antibacteriana contra *S. aureus* resistente a la rifampicina y la meticilina y exhibe potente actividad contra otros patógenos Gram positivos de humanos. Por otra parte, el estudio puntual en la producción de compuestos bioactivos de *S. arenicola* ha sido ampliamente estudiado, como realizado por Ng *et al.* (2014) donde reportan una mayor producción de rifamicinas cuando se somete a un estrés salino.

Tabla 1. Metabolitos secundarios reportados en el género *Salinispora* spp. Tomado y modificado de Jensen et al. (2015).

No.	Especie	Compuesto	Formula Molecular	Masa Atómica	Origen biosintético	Actividad
1	<i>S. tropica</i>	Salinosporamida A	C ₁₅ H ₂₀ ClNO ₄	313.777	PKS-NRPS	Proteosoma
2	<i>S. tropica</i>	Esporolida A	C ₂₄ H ₂₃ ClO ₁₂	538.885	ePKS	Transcriptasa Reversa
3	<i>S. tropica</i>	Salinilactam	C ₂₈ H ₃₉ NO ₅	469.613	Tipo I PKS	ND
4	<i>S. tropica</i>	Sioxantina	C ₄₆ H ₆₂ O ₇	726.9803	Terpeno	ND
5	<i>S. tropica</i>	Antiprotealida	C ₁₂ H ₁₈ ClNO ₄	275.729	PKS-NRPS	Proteosoma
6	<i>S. pacifica</i>	Pacificanona A	C ₂₀ H ₃₄ O ₃	322.482	Tipo PKS	ND
7	<i>S. pacifica</i>	Salinipirona A y B	C ₁₇ H ₂₄ O ₄	292.37	Tipo I PKS	ND
8	<i>S. pacifica</i>	Cianosporosida A	C ₂₁ H ₂₀ ClNO ₆	417.8396	PKSe	ND
9	<i>S. pacifica</i>	Lomaiviticina A	C ₆₈ H ₈₀ N ₆ O ₂₄	417.8396	Tipo II PKS	Citotóxica (ADN)
10	<i>S. pacifica</i>	Enterocina	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₀	444.388	Tipo II PKS	Antibiótica
11	<i>S. arenicola</i>	Salinicetal A	C ₂₂ H ₃₇ NO ₅	395.267	Tipo I PKS	Ornitina Descarboxilasa
12	<i>S. arenicola</i>	Arenicolida A	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₂	805.046	Tipo I PKS	ND
13	<i>S. arenicola</i>	Saliniquinona A-F	C ₂₃ H ₁₆ O ₇	404.369	Tipo II PKS	Citotóxica
14	<i>S. arenicola</i>	Ciclomarin A	C ₅₆ H ₈₂ N ₈ O ₁₁	1043.297	NRPS	Anti-inflamatoria
15	<i>S. arenicola</i>	Ciclomarazina	C ₂₃ H ₃₁ N ₃ O ₃	397.510	NRPS	ND
16	<i>S. arenicola</i>	Arenimicina	C ₃₃ H ₃₃ NO ₁₄	667.613	NRPS	Antibiótica
17	<i>S. arenicola</i>	Arenamida A	C ₃₆ H ₅₇ N ₅ O ₇	671.867	Tipo II PKS	Anti_inflamatoria (NFkB)
18	<i>S. arenicola</i>	Estaurosporinas	C ₂₈ H ₂₆ N ₄ O ₃	466.531	Alcaloide	Proteína quinasa
19	<i>S. arenicola</i>	Isopimara-8,15-dien-19-ol	C ₂₀ H ₃₂ O	288.467	Terpeno	ND
20	<i>S. arenicola</i>	Rifamicina B	C ₃₉ H ₄₉ NO ₁₄	755.805	Tipo I PKS	ARN Polimerasa
21	<i>S. arenicola</i>	Mevinolina	C ₂₄ H ₃₆ O ₅	404.540	PKS	HMG-CoA Reductasa
22	<i>St, Sa, Sp</i>	Desferrioxamina B	C ₂₅ H ₄₈ N ₆ O ₈	560.684	NRPS	Quelante del hierro
23	<i>St, Sa, Sp</i>	Limphostina	C ₁₆ H ₁₄ N ₄ O ₃	310.307	NRPS-PKS	Inmunosupresor

3. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones por microorganismos multi-resistentes tienen una prevalencia común a través de los años en la historia clínica, donde *Staphylococcus* es uno de los géneros de patógenos con mayor predominio. En México entre el 5% y el 10% de los pacientes que ingresan a hospitales contraen una o más infecciones (OMS, 2017), llegando a provocar una tasa de mortalidad del 25.15% una vez que se ha contraído alguna infección (López-Herrera *et al.*, 2012).

Los trabajos de investigación indican que sólo el descubrimiento de compuestos que inhiban dianas desconocidas o nunca abordadas puede satisfacer los requerimientos de antimicrobianos, al menos a mediano plazo. Se sabe que el estrés salino causa cambios importantes en el metabolismo primario y secundario de células bacterianas, incluso bacterias marinas (Kempf y Bremer, 1998). Por otro lado, se ha reportado que la disponibilidad de carbono, nitrógeno y micronutrientes, estimulan la actividad enzimática, dependiendo de la naturaleza del sustrato, promoviendo la síntesis de metabolitos bioactivos (Gill *et al.*, 2003; Xiong *et al.*, 2008). Sin embargo, existe una falta de conocimiento sobre los requerimientos de las actinobacterias marinas con respecto a la fuerza iónica y la fuente de nutrientes para su cultivo y esto dificulta la optimización de las condiciones de crecimiento para los programas de aplicaciones biofarmacéuticas (Tsueng y Lam, 2010). Trabajos realizados en B.C.S., México, donde se aislaron cepas de *Salinispora arenicola* han mostrado que presentan actividad frente a *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis*, por lo que resulta de interés identificar las condiciones de cultivo que permitan la mayor producción de compuestos antimicrobianos frente a las cepas patógenas antes mencionadas.

4. HIPÓTESIS

¿Qué condiciones de cultivo (salinidad, nutrientes, tiempo de cosecha) se deben considerar para tener un mejor crecimiento de *Salinispora arenicola*, que propicie mayor producción de metabolitos antibacterianos frente a cepas de bacterias patógenas resistentes?

Al proporcionar un medio de cultivo adecuado para el crecimiento de *Salinispora arenicola* (cepa PA-Sa-33'-2), el estrés salino inducirá una mayor producción de metabolitos activos contra *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis*.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar el efecto de diferentes condiciones de cultivo en el crecimiento y la actividad antibacteriana de *Salinispora arenicola* frente a bacterias patógenas resistentes

5.2 Particulares

1. Evaluar el efecto de dos medios de cultivo suplementados con diferentes salinidades en el crecimiento de *S. arenicola*.
2. Evaluar la actividad antibacteriana de *S. arenicola* bajo las diferentes condiciones de cultivo frente a cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis*.
3. Realizar un análisis preliminar del perfil químico de extractos más activos de *S. arenicola*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Microorganismos

Salinispora arenicola

La cepa de *S. arenicola* PA-Sa-33'-2, fue previamente aislada de sedimento marino de Punta Arena de La Ventana, B.C.S., dentro del Golfo de California (Lat. 24°03'40''N y Long. 109°49'52''W) de acuerdo al método de Mincer et al., 2002, en colaboración con la Dra. Erika T. Quintana Cano de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN. Para su reactivación se cultivó en placas de Petri con medio GYM (extracto de levadura, glucosa y malta), y se incubó a 30°C en condiciones aeróbicas.

Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis

Las cepas patógenas que se evaluaron pertenecen a la Colección Americana de Cultivos, por sus siglas en inglés ATCC. *Staphylococcus aureus* con clave ATCCBAA-42 y *S. epidermidis* con clave ATCC-1222. Ambas cepas fueron mantenidas en placa de Petri con medio TSA a 4°C, para su reactivación fueron cultivadas en placas de Petri con medio Mueller-Hilton e incubadas por 24 h a 35°C.

6.2 Condiciones de cultivo y determinación de la curva de crecimiento de *S. arenicola*

La cepa de *S. arenicola* fue sembrada en placa de agar marino, colocando 30 µL del cultivo fresco e incubándola durante 7 días a 30°C. Posteriormente, en condiciones estériles se transfirió a caldo GYM en matraz de 250 ml. El cultivo se colocó en agitación durante 5 días a 30°C y 150 rpm, este crecimiento fue considerado como "pre-inoculo".

La evaluación del crecimiento de *S. arenicola*, se llevó a cabo en diferentes medios de cultivo que difieren en la fuente de carbono y nitrógeno, GYM (extracto

de levadura, glucosa y malta) y SYP (almidón, extracto de levadura y peptona). Estos a su vez con diferente salinidad, GYM-agua marina, GYM-2.5%, GYM-4.5 %, SYP-agua marina, SYP-2.5 % y SYP-4.5%. El escalamiento se realizó añadiendo 1 ml del pre-cultivo a 200 ml de caldo fresco, con cada una de las condiciones a evaluar a 30°C, manteniendo una agitación constante a 150 rpm. Para la determinación de UFC/ml se tomó un 1 ml del pre-cultivo, se realizaron diluciones seriadas y se sembró en agar marino. La carga bacteriana se determinó al cabo de siete días de incubación a 30° C. El crecimiento se determinó tomando una muestra de 5 ml del cultivo cada tres o cuatro días durante 47 días, la biomasa fue recuperada por centrifugación a 4,000 g durante 10 min. El crecimiento del cultivo se calculó y fue expresado como porcentaje usando la siguiente formula: volumen de paquete celular / volumen de cultivo x 100% (Ng *et al.*, 2014).

6.3 Adaptación de *S. arenicola* al estrés salino

En la evaluación del crecimiento y desarrollo de la cepa bajo condiciones de cultivo de estrés salino, se realizó una adaptación celular, tomando 40 mg de biomasa celular del pre-cultivo a los 14 días. Esta biomasa fue inoculada nuevamente en 50 ml de caldo con la condición a evaluar, 2.5% o 4.5% de salinidad. A los 5 días de crecimiento se realizó el escalamiento tomando 1 ml del pre-cultivo en 200 ml de caldo a 30° C y manteniendo en agitación constante 150 rpm.

6.4 Obtención de extractos orgánicos

Para la obtención de los extractos se realizó una extracción líquido-líquido. Para ello se tomaron 90 ml del cultivo después de 7, 14, 21, 28 y 35 días de incubación, se le adicionaron 90 ml de acetato de etilo con un tiempo de contacto de 90 min. Posteriormente se separó la fase orgánica y la fase acuosa se sometió dos veces más al mismo proceso. Por último, las fases orgánicas obtenidas fueron unidas y concentradas a presión reducida en un rotaevaporador a 36°C hasta sequedad.

Los extractos se pesaron para obtener su rendimiento y se mantuvieron a -20 °C hasta su uso (Cartuche-Flores, 2013).

6.5 Análisis preliminar del perfil de compuestos de extractos de *S. arenicola*

Se realizó un análisis preliminar en CCF en fase normal y fase reversa, con un sistema de elución de CH₂Cl₂:MeOH (85:15) y MeOH:acetona:H₂O (6:1:3) respectivamente.

Para determinar la naturaleza estructural y conocer sus constituyentes biológicamente activos se realizó la técnica del tamizaje químico para determinar la presencia o ausencia de los principales grupos de metabolitos con la utilización de diferentes reveladores, una vez revelados se observaron bajo diversos criterios de acuerdo al análisis (Tabla 2) (Harborne, J. B, 1998).

Tabla 2. Reveladores empleados para la detección de compuestos químicos

Núcleo Fitoquímico	Revelador
Alcaloides	Dragendorff
Triterpenos y /o esteroides	Lieberman-Burchard
Fenoles y taninos	FeCl ₃ al 5% en HCl 0.5 N
Flavonoides	AlCl ₃ al 1% en EtOH
Cumarinas	KOH al 10% en EtOH
Saponinas	H ₂ SO ₄ al 10% en EtOH + vainillina 8%
Aminoácidos	Ninhidrina

Interpretación:

- **Alcaloides.** Se observó la placa en UV, la prueba es tomada como positiva al observar coloraciones rojas o naranjas.
- **Triterpenos y/o esteroides.** Calentar la placa a 85-90°C por 10 min. Observar a simple vista el cambio de coloración. Un color azul o verde es positivo para esteroides insaturados. Un color rojo, rosado o violeta indica la presencia de triterpenos insaturados y un color amarillo pálido indicó la presencia de esteroides o triterpenos saturados.
- **Fenoles y taninos.** Calentar la placa a temperatura de 110°C hasta observar manchas oscuras, grises o negras y observar a longitud de onda 254 y 260 nm. Un color rojo indica presencia de fenoles y una coloración azul la presencia de taninos.
- **Flavonoides.** Se observó la placa bajo UV a una longitud de 360 nm. La prueba se consideró positiva al observar una fluorescencia amarilla, rosa o azul.
- **Cumarinas.** Se observó la placa bajo UV a 365 nm, la prueba se consideró positiva al observar fluorescencia azul.
- **Saponinas.** La prueba se consideró positiva al observar manchas color rosas, violetas o amarillas.
- **Aminoácidos.** La prueba se consideró positiva al observar coloraciones azules o moradas.
-

6.6 Bioensayos de actividad antimicrobiana

Para evaluar la bioactividad de la cepa de *Salinispora arenicola* se realizaron ensayos *in vitro* frente *Staphylococcus aureus* (ATCCBAA-42) y *S. epidermidis* (ATCC-1222).

Para los bioensayos las cepas patógenas se sembraron en medio TSA, y se incubaron por 24 h a 35° C. Posteriormente se preparó una suspensión con las cepas patógenas (solución salina 0.8 %) y se ajustó a una densidad óptica $DO_{585nm}=1$ (concentración aproximada de 1×10^8 cel/ml). Se tomó una alícuota de 100 μ L y se realizó una siembra masiva con un hisopo estéril en placas con agar Mueller-Hinton.

En el caso de los extractos se utilizaron sensidiscos impregnados con 100 y 250 μ g de extracto. Para lo cual se preparó una dilución de los extractos a una concentración conocida para obtener una concentración final de 100 y 250 por μ g disco. Los discos se dejaron secar. Se prepararon controles de disolvente donde se colocó sólo el disolvente con el que se disolvió el extracto y como control positivo se utilizó ampicilina 25 μ g/ml. Se observaron y midieron los halos de inhibición a las 24 h de cultivo. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado. Los extractos que resultaron más activos fueron sometidos a fraccionamiento, evaluando las fracciones obtenidas.

6.7 Concentración mínima inhibitoria de los extractos

Se evaluó la actividad antibacteriana de los extractos más activos de *S. arenicola*, frente a las cepas patógenas *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* utilizando el método de microdilución en caldo (Tinh *et al.*, 2016). Para esto, se prepararon cultivos de 24 h de las cepas patógenas ajustados con solución salina a una DO_{585nm} de 1, para obtener una concentración de 1×10^8 cel/ml. En placas de 96 pozos se agregaron 20 μ L de la suspensión de *S. aureus* y *S. epidermidis*, 20 μ L de las diferentes concentraciones de los extractos obtenidos (Fig. 1), y 160 μ L de medio Mueller-Hilton en un lector de microplaca TECAN línea infinite M 1000 PRO. Como control positivo se utilizó el antibiótico gentamicina a una concentración de

10 µg/µl, mientras que como control negativo se utilizó el disolvente que se usó para diluir los extractos DMSO al 5 % con la suspensión de las cepas patógenas.

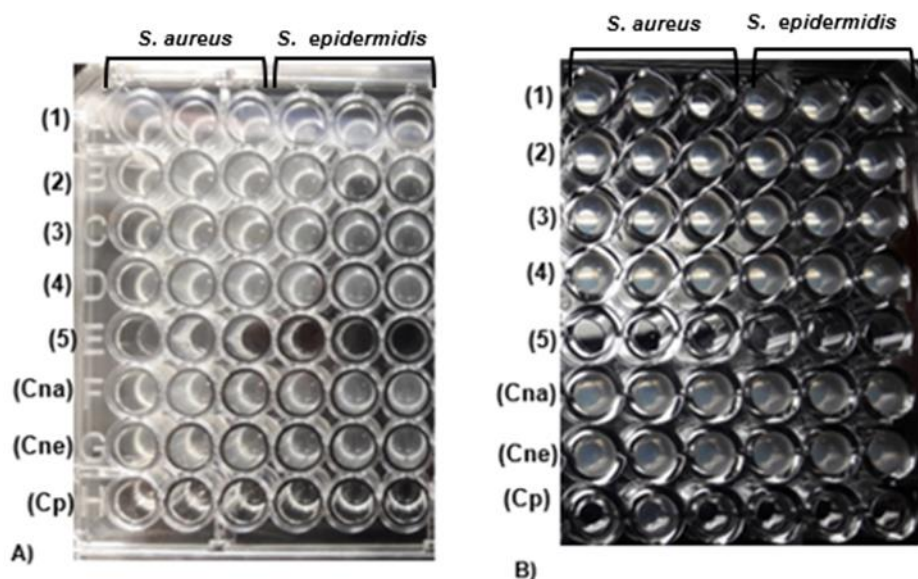


Figura 1. Bioensayo de evaluación de la mínima concentración inhibitoria (CMI) en microplaca de los extractos A) GYM-21 días/2.5%. B) CMI del extracto SYP-21 días/4.5%. Diluciones (A) (µg/ml): (1): 50; (2): 25; (3): 12.5; (4): 6.25; (5): 1.5. Diluciones (B) (µg/ml): (1): 200; (2): 100; (3): 50; (4): 25; (5): 12.5. Cna: control de crecimiento microbiano *S. aureus*. Cne: control de crecimiento microbiano *S. epidermidis*. Cp: control positivo de inhibición por gentamicina (10 µg/ml).

6.8 Fraccionamiento e identificación de compuestos mediante técnicas de replicación (¹H-RMN) de *S. arenicola*

Se realizó un primer fraccionamiento líquido-líquido de los extractos de *S. arenicola* que presentaron una mayor actividad, a través de un gradiente de polaridad creciente. El extracto crudo se disolvió en 50 mL agua con 10 % de MeOH, posteriormente se comenzó con el fraccionamiento con 50 mL de hexano (n=3, 50 ml). La fase de hexano se concentró a presión reducida para dar lugar a la primera fracción (Hex). La fase acuosa fue nuevamente con agua: MeOH al 35 % y diclorometano (n=3, 50 ml), se concentró la fase orgánica de diclorometano para dar lugar a la segunda fracción (DCM). La fase acuosa restante se concentró para eliminar el metanol y posteriormente se realizó la separación líquido-líquido con acetato de etilo (n=3, 50 ml). Las dos fases restantes, acuosa y acetato de

etilo se concentraron a presión reducida para dar lugar a las fracciones de AcOEt y H₂O.

Las fracciones donde se obtuvo mayor rendimiento se sometieron a cromatografía en fase reversa siguiendo la metodología descrita por Blunt et al. (1987). La fase estacionaria utilizada fue gel de sílice 100 C18 (0.040- 0.063 mm, 230-400 mesh ASTM) (Fluka, 60758). Cada uno de los extractos fue incorporado a la columna adsorbido en el mismo gel de sílice. Como fase móvil se utilizaron 20 ml de la mezcla de agua y metanol con gradiente de polaridad, MeOH al 100%. Se obtuvieron 8 fracciones.

El curso de cromatografía se monitoreó con un análisis en cromatografía de capa fina (TLC) para identificar el perfil de compuestos de los extractos se emplearon cromatoplasmas (20x20 cm) de silicagel 60 F254 con base de aluminio (Merck, 105554).

Para el revelado de la CCF se utilizó Oleum pulverizado con una disolución H₂SO₄:H₂O:AcOH (1:4:20) y posteriormente se calentó. La detección por fluorescencia se realizó empleando una lámpara UV Vilbert Lourmat a una longitud de onda de 254 nm.

Para identificar señales de posibles compuestos se realizaron espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en los espectrómetros Bruker Avance 400 (400 MHz) para ¹H-RMN y Bruker AMX 500 para ¹H-RMN (500 MHz) ¹³C-RMN (125.7 MHz). Para la adquisición de los datos fue empleado cloroformo deuterado como disolvente y cloroformo como patrón de referencia interna (δ_H 7.25 ppm; δ_C 77.0 ppm) o metanol deuterado y metanol como patrón de referencia (δ_H 3.31 ppm; δ_C 49.86 ppm). Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en partes por millón (ppm), en relación al disolvente empleado como referencia interna.

La información espectroscópica fue procesada utilizando el programa MestReNova (versión 11.0), Mestrelab Research S. L. 2017, y comparados con la literatura.

7. RESULTADOS

7.1 Curva de crecimiento de *S. arenicola* en diferentes medios de cultivo

Para la evaluación del crecimiento de *S. arenicola*, se realizó un pre-cultivo para determinar el número de unidades formadoras de colonias al inicio de la curva de crecimiento. Se obtuvo un valor de 4.6×10^4 UFC /mL como carga bacteriana con el que se inició el escalado. Se observaron colonias características de *S. arenicola*, de color naranja brillante y con bordes enteros en forma circular y con una elevación plana, dicha morfología se apreció al cabo de los siete días de incubación (Fig. 2).



Figura. 2. Morfología de *Salinispora arenicola* cepa PA-Sa-33'-2.

La determinación de la curva de crecimiento bajo diferentes condiciones de salinidad en medio GYM se llevó a cabo durante 42 días, con toma de muestra cada 3-4 días por medio del volumen del paquete celular (VPC%) (Fig. 3). Durante los primeros 7 días de cultivo, las células se encuentran en fase de adaptación y el comportamiento es similar en las diferentes salinidades, posteriormente el crecimiento se ve modificado por el estrés salino. En las salinidades de 2.5 y 4.5 % se observan condiciones similares, con una fase exponencial entre los 8 y 17 días, iniciando posteriormente la fase estacionaria. Los valores de biomasa (VPC) fueron prácticamente la mitad de lo obtenido con la salinidad intermedia (3.5%). Con esta condición de salinidad la fase exponencial es más larga y la fase estacionaria inicia hasta los 32 días (Fig. 3). El crecimiento evaluando la fuente de carbono y nitrógeno tiene un cambio significativo, al suplementar con medio SYP

(Fig. 4). Existe una mayor fluctuación en las etapas de crecimiento, observando de la misma manera que a una salinidad de 3.5% existe un mayor volumen de paquete celular.

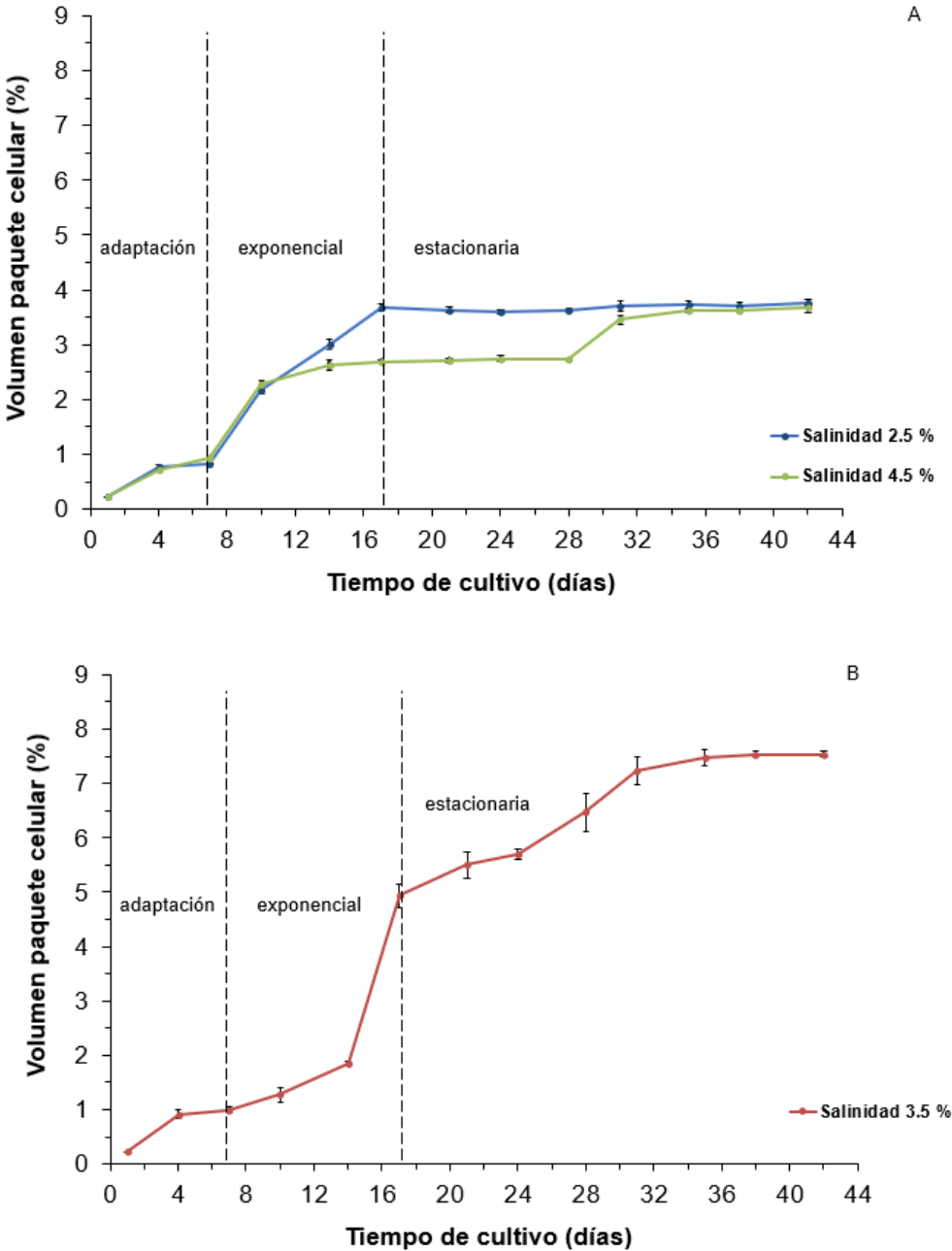


Figura. 3 Curva de crecimiento de *S. arenicola*, cultivada en medio GYM a diferentes salinidades 2.5, 3.5 y 4.5%.

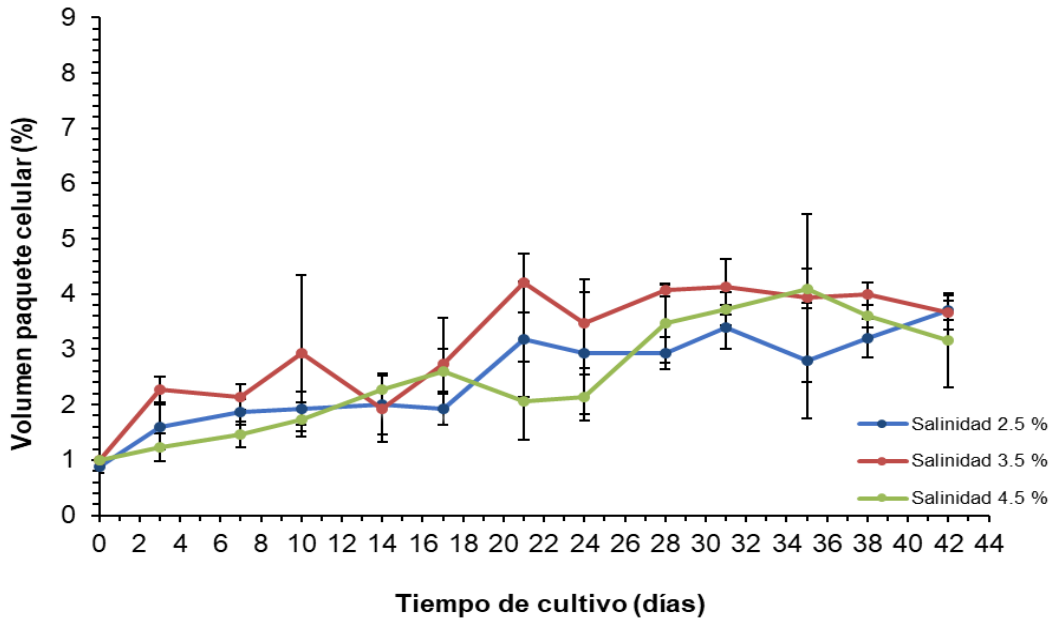


Figura. 4 Curva de crecimiento de *S. arenicola* cultivada en medio SYP a diferentes salinidades 2.5, 3.5 y 4.5%.

Al comparar la biomasa final obtenida de *S. arenicola* en los dos medios de cultivo y en las diferentes salinidades (Fig. 5) se observó que la mayor biomasa (7.1 % de VPC) se obtiene en el medio GYM con 3.5% de salinidad. Con el medio SYP las mayores biomásas (3.6 % de VPC) se obtuvieron con salinidades de 2.5 y 3.5 %.

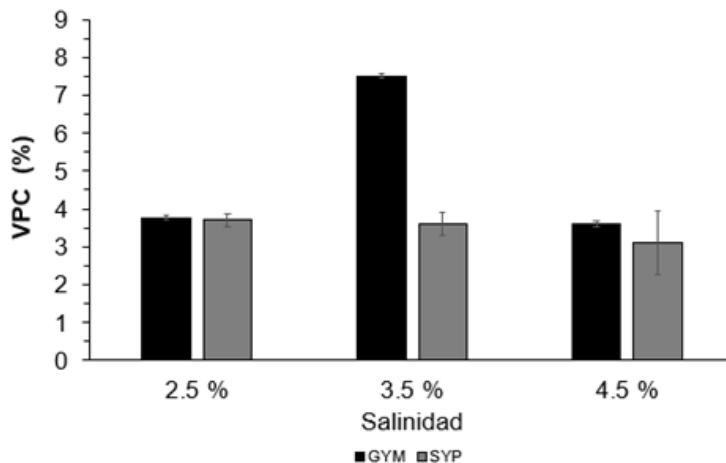


Figura. 5 Efecto de dos medios de cultivo y diferentes salinidades en el crecimiento de *S. arenicola* a los 43 días de cultivo. Valores promedio y desviación estándar.

7.2 Caracterización de extractos orgánicos

En la Tabla 3 se observan los pesos obtenidos de los diferentes extractos conforme al tiempo de cultivo y la condición de cultivo evaluada.

En el caso de los extractos obtenidos de la cepa cultivada en los diferentes tratamientos en medio GYM, el peso aumenta conforme con la edad del cultivo y el mayor rendimiento se obtuvo con la salinidad de 3.5%, lo cual parece tener una relación con la biomasa obtenida.

Los extractos obtenidos de la cepa cultivada en los diferentes tratamientos en medio SYP, el peso no parece tener una relación con la biomasa obtenida, de hecho, los extractos a los 35 días de cultivo a las salinidades de 2.5 y 4.5% presentaron un mayor rendimiento a los obtenidos de medio GYM aun cuando la biomasa fue menor.

Tabla 3. Obtención de extractos de *S. arenicola* bajo diferentes condiciones de cultivo.

Tiempo de cultivo (días)	Peso de extractos (mg)					
	2.5 %		3.5 %		4.5 %	
	GYM	SYP	GYM	SYP	GYM	SYP
7	3.0	6.4	10.3	3.7	4.4	4.9
14	8.6	12.1	16.5	11.2	6.9	7.4
21	8.6	7.8	17.7	9.5	11.1	10.4
28	11.4	7.1	24.1	16.8	14.8	6.5
35	12.3	14.8	25.5	18.7	14.8	16.9

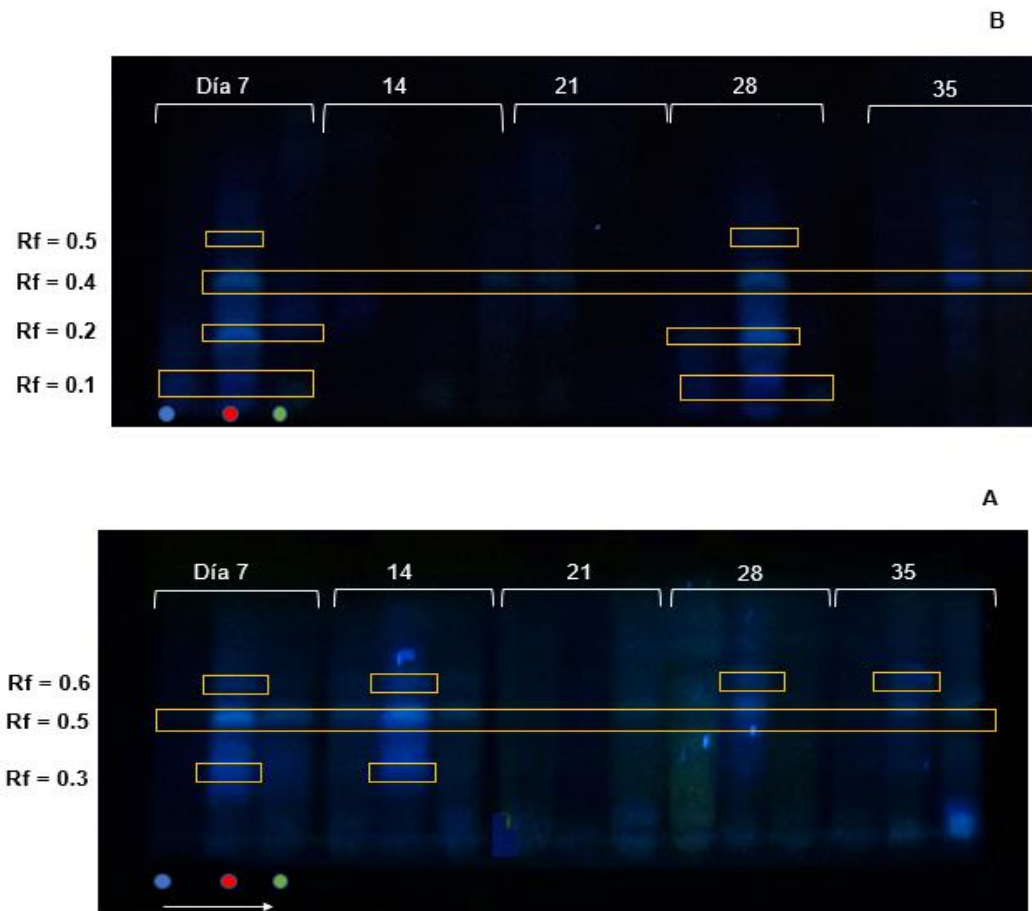


Figura 6. Cromatografía en capa fina de los extractos de *S. arenicola*, en diferentes días de cultivo, tres salinidades (2.5% en azul, 3.5% en rojo y 4.5% en verde) y dos medios de cultivo, (A) GYM y (B) SYP. Rf = Factor de retención.

Un análisis preliminar de los extractos en cromatografía en capa fina de todas las condiciones evaluadas mostró variaciones en el perfil de metabolitos (Fig. 6). En los extractos del medio GYM se observaron señales de compuestos que se presentan en todos los extractos con factor de retención (Rf) de 0.5, señales de compuestos con Rf de 0.3 y 0.6 que solo se presentan en la salinidad de 3.5 % (Fig. 6 A). Por otra parte, en los extractos del medio SYP algunas señales de compuestos se comparten como Rf de 0.4, también se puede observar que algunas señales de compuestos se presentan en las diferentes salinidades como Rf de 0.1 y 0.2 en el día 7 y 28, y la señal del compuesto con Rf de 0.5 que se observa solo en la salinidad de 3.5 % (Fig. 6 B).

7.3 Actividad antibacteriana de los extractos de *S. arenicola* frente a bacterias patógenas.

En la evaluación de la actividad antibacteriana de *S. arenicola* bajo las diferentes condiciones de cultivo, se analizaron un total de 30 extractos frente a las cepas resistentes de *S. aureus* (ATCCBAA-42) y *S. epidermidis* (ATCC-12228). Se realizó una prueba de susceptibilidad a otros antibióticos, interpretada bajo las normas establecidas por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (**Tabla 4**). El control negativo que fue el disolvente utilizado en los extractos en todos los ensayos, no presentó actividad en ninguno de los ensayos realizados.

Tabla 4. Susceptibilidad de *S. aureus* (ATCCBAA-42) y *S. epidermidis* (ATCC-12228), a diversos antibióticos.

	Antibióticos	Concentración	Halo de inhibición (mm)		Interpretación
			<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	
1	Gentamicina	10 µg	23 mm	24 mm	Susceptible
2	Kanamicina	30 µg	25 mm	23 mm	Susceptible
3	Cloranfenicol	30 µg	32 mm	27 mm	Susceptible
4	Estreptomina	25 µg	19 mm	18 mm	Intermedia
5	Ampicilina	25 µg	0 mm	0 mm	Resistente

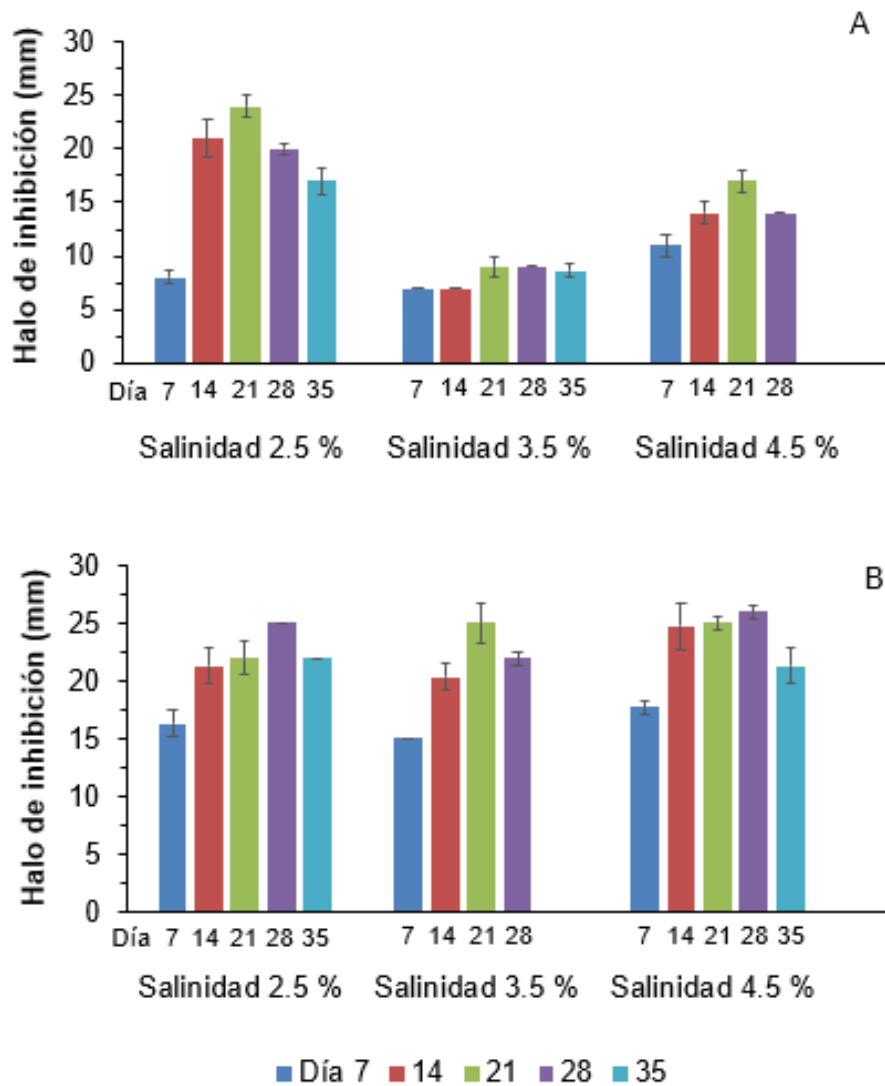


Figura 7. Actividad antibacteriana de los extractos de *S. arenicola* obtenidos en (A) medio GYM y (B) medio SYP bajo diferentes condiciones de cultivo frente a *S. aureus*, a una concentración de 100 µg. Valores promedios y desviación estándar.

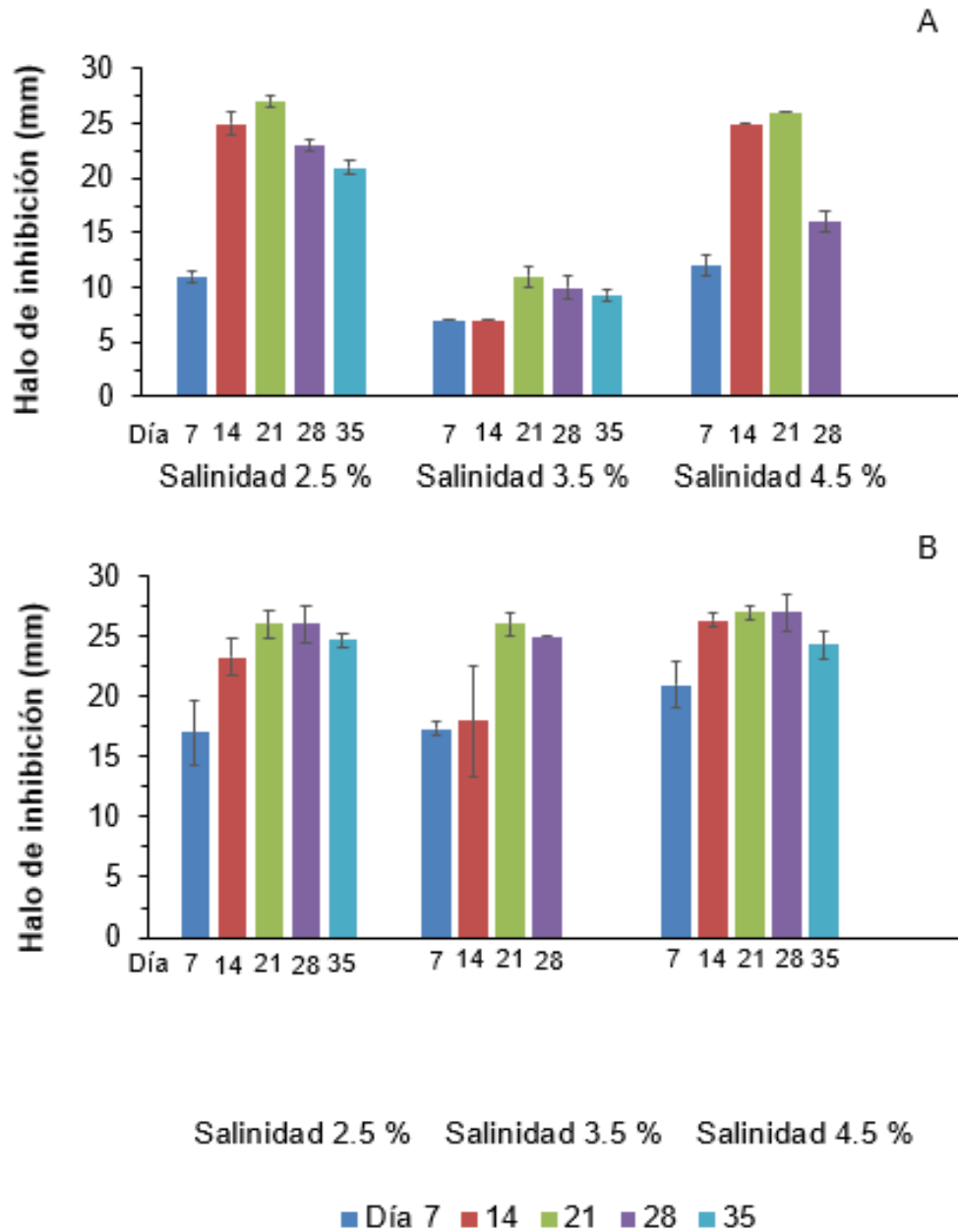


Figura 8. Actividad antibacteriana de los extractos de *S. arenicola* obtenidos en (A) medio GYM y (B) medio SYP bajo diferentes condiciones de cultivo frente a *S. aureus*, a una concentración de 250 µg. Valores promedios y desviación estándar.

Actividad de los extractos en las diferentes salinidades en medio SYP

En el medio SYP al igual que con el medio GYM, la mayor actividad antibacteriana se presentó a los 21 días de cultivo frente a las dos cepas. Con respecto a la salinidad, la mayor actividad se observó con el tratamiento de 4.5%. Frente a *S. aureus* se observaron halos de inhibición de 25.3 ± 1.5 y 25.7 ± 0.5 mm a una concentración de 100 y 250 μg , respectivamente, similares a los observados frente a *S. epidermidis* (Figs. 6-9).

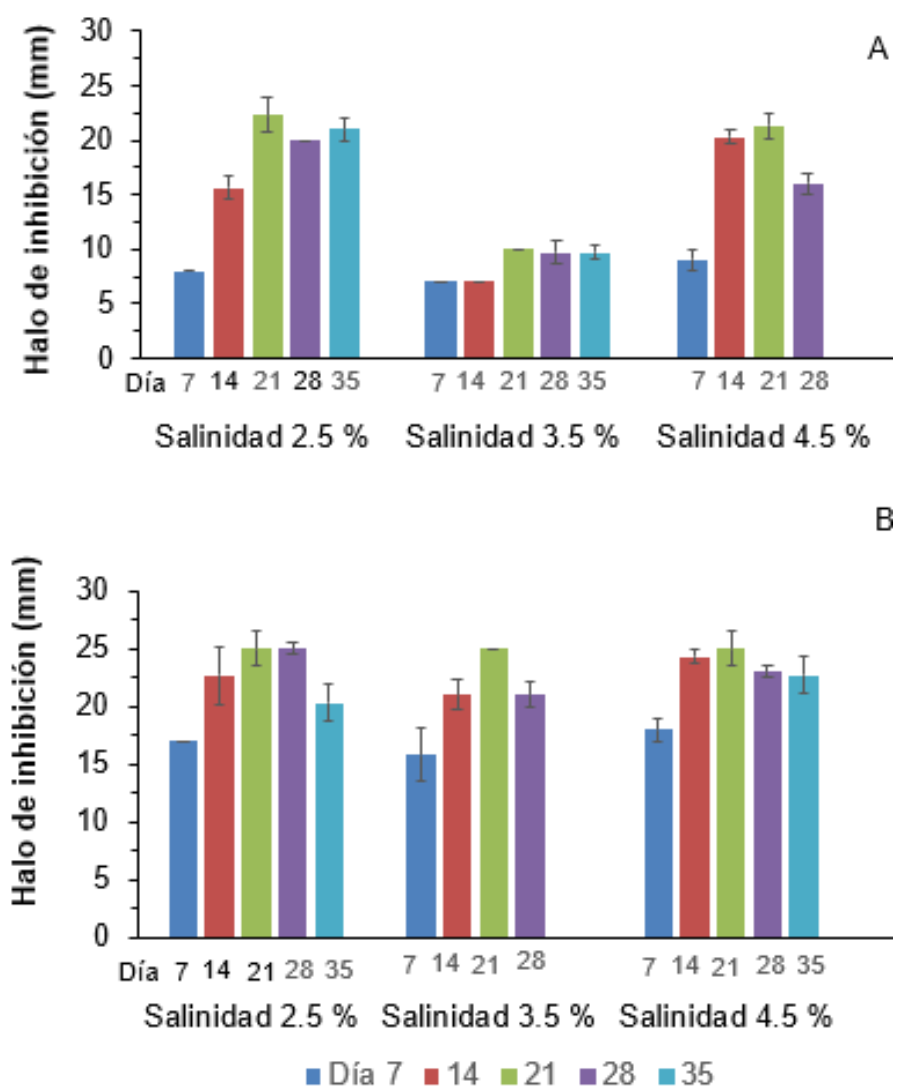


Figura 9. Actividad antibacteriana de los extractos de *S. arenicola* obtenidos en (A) medio GYM y (B) medio SYP bajo diferentes condiciones de cultivo frente a *S. epidermidis*, a una concentración de 100 μg . Valores promedios y desviación estándar.

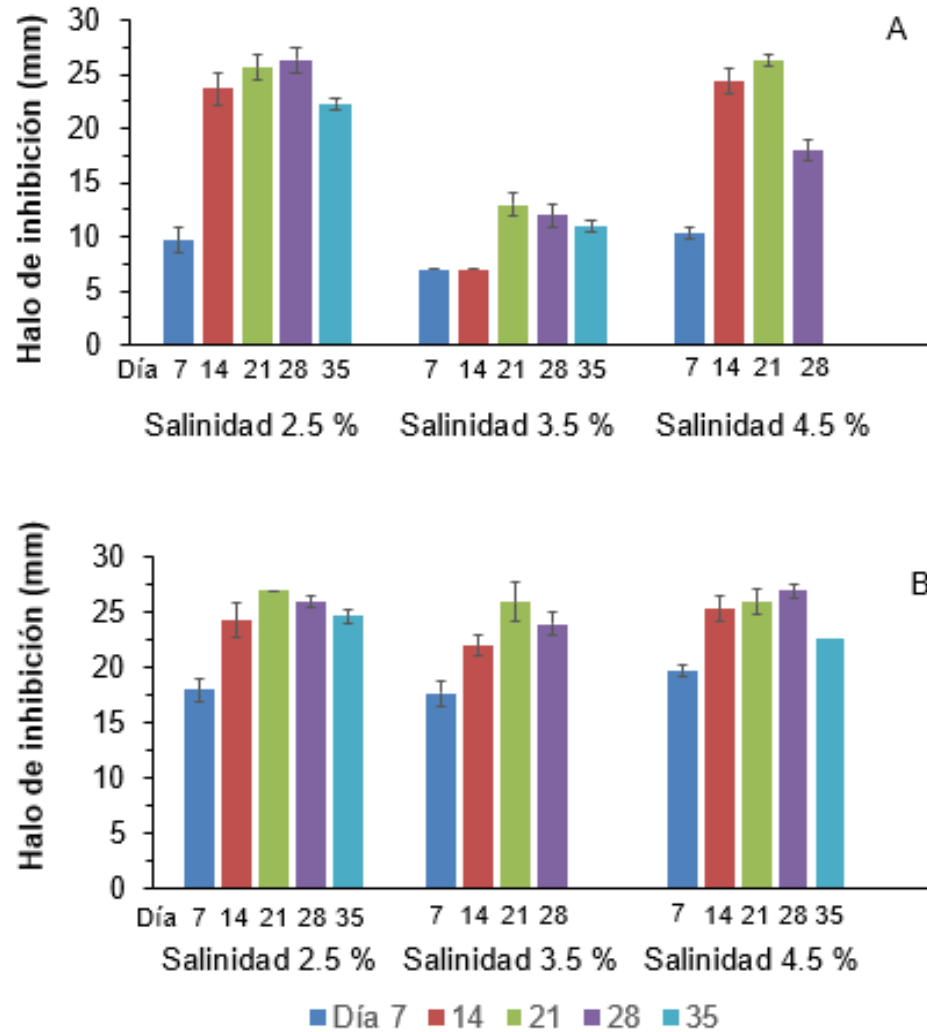


Figura 10. Actividad antibacteriana de los extractos de *S. arenicola* obtenidos en (A) medio GYM y (B) medio SYP bajo diferentes condiciones de cultivo frente a *S. epidermidis*, a una concentración de 250 µg. Valores promedio y desviación estándar

En la figura 11 se observan los halos de inhibición obtenidos con los extractos más activos (Medio GYM-2.5 % de salinidad) y medio SYP-4.5 % de salinidad) frente a *S. aureus* y *S. epidermidis*.

A partir de los extractos que presentaron la mejor actividad se determinó la concentración mínima inhibitoria MIC en cepas patógenas (**Tabla 5**). Los resultados indican que el extracto obtenido con el medio SYP a una salinidad de 4.5% fue el que presentó la mayor actividad con una MIC de 1.52 µg/ml.

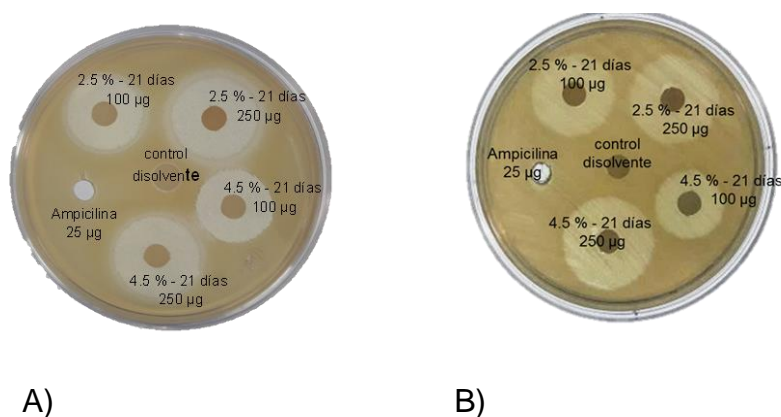


Figura 11. Halos de inhibición de los extractos más activos de *S. arenicola*. Medio GYM (2.5 %) y medio SYP (4.5 %) frente a A) *Staphylococcus aureus* y B) *S. epidermidis*.

Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos más activos de *Salinispora arenicola*.

Extracto	CMI (µg/ml)	
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
GYM-21 días/2.5% salinidad	12.5	12.5
SYP-21 días/4.5% salinidad	1.52	1.52

7. 4 Estructura química de los extractos con mayor actividad antibacteriana de *S. arenicola*

La identificación cualitativa de los diferentes tipos de compuestos presentes en los extractos se realizó utilizando la técnica del tamizaje químico (Harborne, 1998). Mediante el uso de cromatografía en capa fina (CCF), las placas fueron evaluadas con diferentes reveladores (**Tabla 2**) para identificar la presencia de los principales componentes (**Tabla 6**).

Tabla 6. Análisis preliminar del perfil de metabolitos de los extractos de *S. arenicola*, bajo las condiciones que presentaron mayor actividad antibacteriana. (+) Prueba positiva.

Extractos de <i>S. arenicola</i>										
Compuesto químico	GYM- 2.5 %					SYP – 4.5 %				
	7	14	21	28	35	7	14	21	28	35
Alcaloides										
Triterpenos y/o esteroides										
Fenoles y taninos			+		+					
Flavonoides.		+	+			+	+	+	+	+
Cumarinas		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saponinas		+	+			+	+	+	+	+
Aminoácidos			+					+		

Se realizó el fraccionamiento de los extractos de 21 días de cultivo en las condiciones de GYM- 2.5% y SYP- 4.5% (**Tabla 7**) ya que presentaron la mayor actividad frente las cepas patógenas *S. aureus* (ATCCBAA-42) y *S. epidermidis* (ATCC-12228). Se obtuvieron cuatro fracciones de cada extracto. Obteniendo mayor recuperación al utilizar como solvente diclorometano y H₂O.

Tabla 7. Fraccionamiento de los extractos de 21 días de cultivo de *S. arenicola* en diferentes condiciones.

Fracción	Biomasa en fracciones obtenidas (mg)	
	GYM - Sal. 2.5%	SYP- Sal. 4.5%
Hexano	1.0	4.8
Diclorometano	5.5	19.3
Acetato de etilo	2.5	8.4
H ₂ O	5.4	16.9

Se realizó una purificación usando como fase estacionaria gel de sílice 100 C-18, comenzando con la incorporación de la “cabeza” de la columna constituida por el extracto a purificar adsorbido en el mismo gel de sílice. Como resultado de esta purificación se identificaron dos productos mayoritarios en los extractos y fracciones analizadas, los datos de ¹H (Tabla. 8) confirmaron el primer producto identificado como ácido fenilacético.

En el espectro de ¹H-RMN en CDCl₃ de la fracción de DCM del extracto GYM-salinidad 2.5%, se observan las señales de un compuesto mayoritario (Figs. 12), que presenta una señal a δ_H 3.66 ppm, singlete (s), que corresponde a dos protones metilénicos y un grupo de señales entre δ_H 7.25 y 7.36 ppm, multiplete (m), que corresponden a cinco protones aromáticos. La comparación de estos datos espectroscópicos con los publicados previamente por Morrow et al. (1998) y Leggio et al. 2012. permitió establecer la estructura del compuesto mayoritario ácido fenilacético (**1**) (Tabla 8).

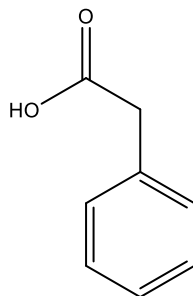


Tabla 8. Desplazamiento de ^1H RMN de ácido fenilacético en CDCl_3 . Valores de referencia de acuerdo con los datos espectroscópicos de Leggio et al. 2012.

#	Fracción GYM-salinidad 2.5%/ DCM δH	Referencia δH
1	---	---
2	3.66 (s)	3.67 (s)
3	---	---
4	7.25 (m)	7.29 (m)
5	7.36 (m)	7.41 (m)
6	7.25 (m)	7.29 (m)
7	7.36 (m)	7.41 (m)
8	7.25 (m)	7.29 (m)

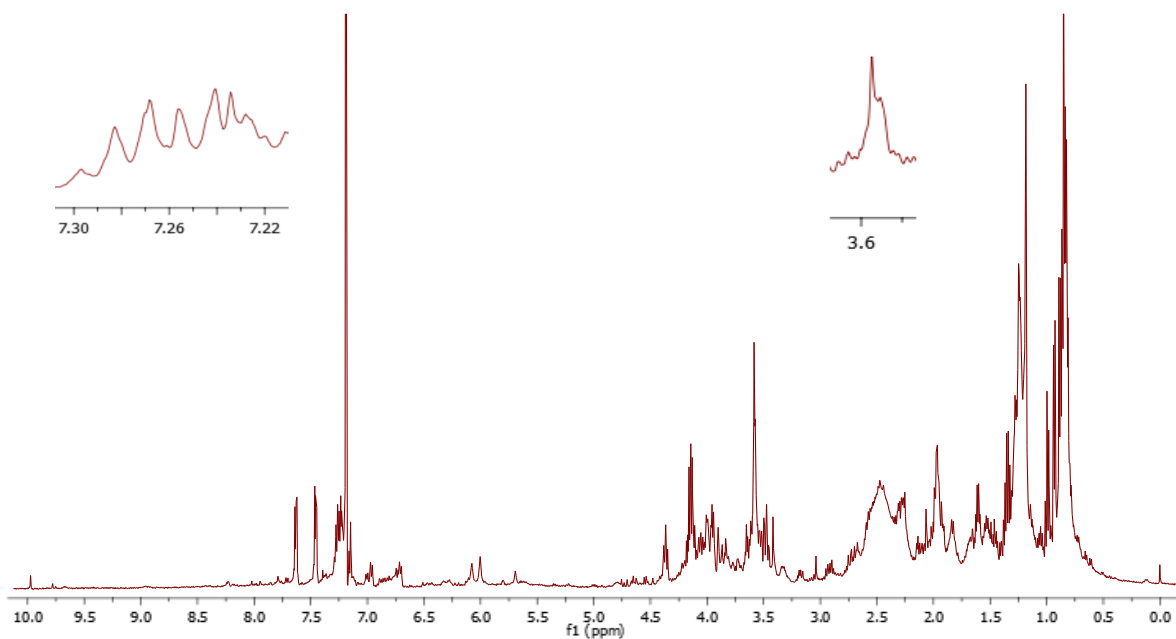
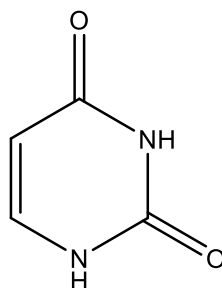


Figura 12. Espectro de ^1H -RMN de la fracción de DCM del extracto GYM- salinidad 2.5% en CDCl_3 donde se observan desplazamientos químicos característicos del compuesto ácido fenilacético (1).

El espectro de RMN de ^1H en CD_3OD de la fracción SYP- salinidad 4.5%/H₂O (Fig. 13), mostró señales con un desplazamiento químico de δ_{H} 5.61 corresponden a un doblete (d), $J = 14.5$ Hz) y δ_{H} 7.40 (d, $J = 14.5$ Hz), al comparar con la literatura (Rathnayake *et al.*, 2018) se logró identificar la presencia del compuesto uracilo (**2**) como compuesto mayoritario en esta fracción (**Tabla. 9**).



2

Tabla 9. Desplazamiento de ^1H RMN de uracilo en CD_3OD . Valores de referencia de acuerdo con los datos espectroscópicos de Rathnayake *et al.* 2018

#	Fracción SYP- salinidad 4.5%/H ₂ O δ_{H}	Referencia Rathnayake <i>et al.</i> 2018 δ_{H}
1	---	---
2	---	---
3	---	---
4	---	---
5	5.61 (d)	5.61 (d)
6	7.40 (d)	7.39 (d)

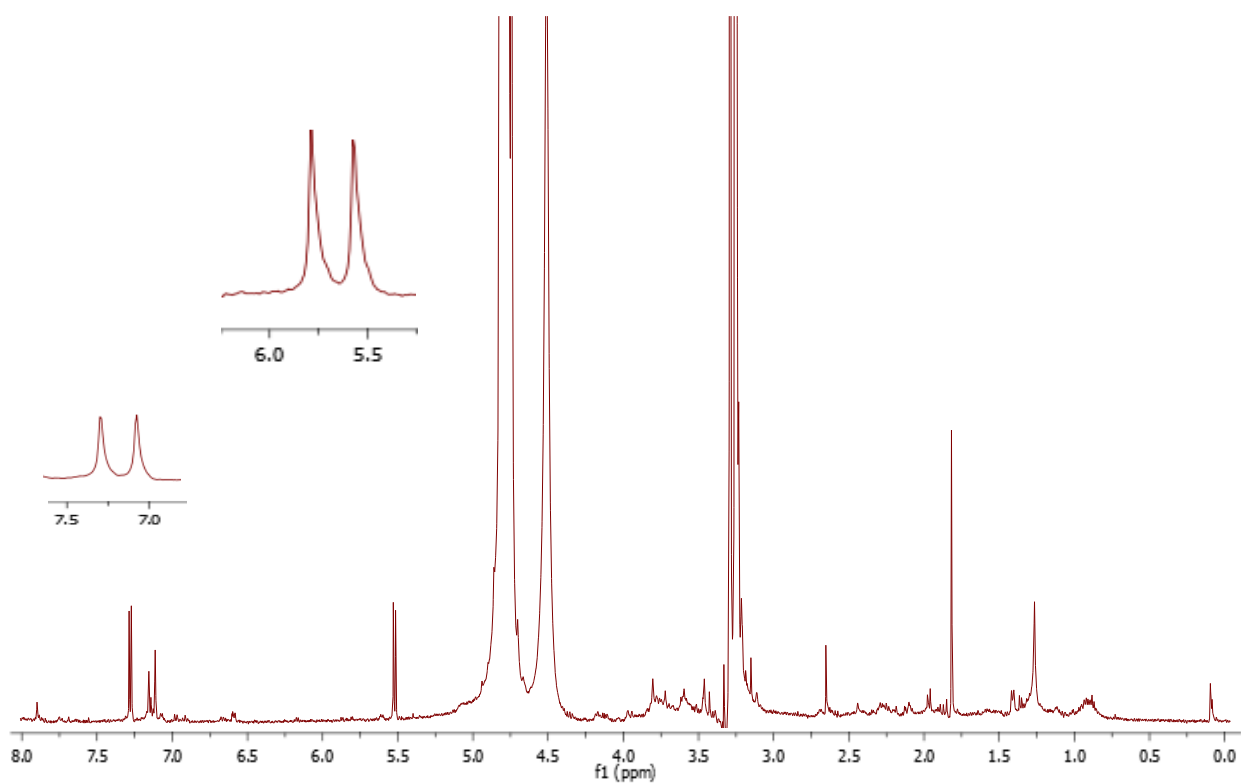


Figura 13. Espectro de ^1H -RMN de la fracción SYP- salinidad 4.5%/H₂O en CD₃OD donde se observan desplazamientos químicos característicos del compuesto uracilo (**2**).

8. DISCUSIÓN

Las actinobacterias marinas han sido reconocidas como una fuente importante de compuestos bioactivos (Íñiguez-Martínez *et al.*, 2016). El enfoque metabólico se ha utilizado para caracterizar la variación en la producción de metabolitos secundarios cuando los cultivos se someten a diferentes condiciones. La optimización de la condición de cultivo es un proceso crítico para explotar la capacidad total de las cepas (Xiong *et al.*, 2008). En el presente estudio se evaluó el efecto de dos diferentes medios de cultivo que difieren en la fuente de carbono y nitrógeno, así como cambios en la concentración de salinidad y días de cultivo, este efecto fue analizado a través de la actividad antibacteriana frente a dos cepas de bacterias patógenas de importancia clínica.

Para estas bacterias filamentosas, se han reportado numerosos medios de cultivo que tienen en su composición almidón, glucosa y fuentes inorgánicas de nitrógeno. Estos microorganismos son capaces de degradar una gran variedad de sustratos dependiendo de su naturaleza, sus estructuras simples y complejas, que implican un uso selectivo de la fuente de carbono, por lo cual, se utilizan azúcares y fuentes orgánicas de nitrógeno (Waksman, 1950). En investigaciones realizadas con actinobacterias para producción de metabolitos de interés, se utiliza glucosa o moléculas complejas como fuente de carbono y fuentes orgánicas de nitrógeno como peptona o extracto de levadura que contienen una alta carga proteica para una mayor concentración de metabolitos bioactivos (Waksman, 1950; Ferreira-Torres *et al.*, 2012). En esta investigación se utilizaron dos medios de cultivo, SYP conformado por almidón, extracto de levadura y peptona, el cual ha sido ampliamente utilizado para el crecimiento de *S. arenicola* (Ng *et al.*, 2013; Ng *et al.*, 2014) y el medio GYM, que contiene glucosa, levadura y malta, utilizado en el crecimiento de otras actinobacterias (Schneemann *et al.*, 2010; Kurtböke *et al.*, 2015). La comparación de estos dos medios en cuanto al crecimiento de *S. arenicola* sólo dio lugar a diferencias significativas, en la condición de salinidad de 35% (agua de mar). El mayor crecimiento se obtuvo al utilizar medio GYM (3.5% salinidad) dando lugar a un Porcentaje del volumen de paquete celular (PVC) de 7.5%. Mientras que con el medio SYP se obtuvo un crecimiento de PVC de 3.5%,

lo que concuerda con el trabajo de Ng et al. (2014), que reportan un valor de PVC de 3.25% en medio SYP con 1% de NaCl.

El uso de la glucosa como fuente de carbono en medios de cultivo promueve el incremento de biomasa, aún cuando se utilice en bajas concentraciones (Ferreira-Torres *et al.*, 2012). Para el caso de la cepa *S. arenicola*, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, en condiciones de salinidad de 3.5% (agua de mar) la utilización de glucosa promueve el crecimiento de *S. arenicola* prácticamente al doble. Sin embargo, en las otras condiciones de salinidad (2,5 y 4.5%) no se observan diferencias al utilizar glucosa o almidón como fuente de carbono y al parecer es la concentración de la salinidad la que tiene el mayor efecto en la biomasa obtenida.

El conocimiento sobre los requisitos de crecimiento de las actinobacterias Gram positivas marinas con respecto a la fuerza iónica en los medios de cultivo resultan interesante para el estudio y búsqueda de compuestos bioactivos. Aún son pocos los estudios sobre los requisitos de crecimiento de las actinobacterias tanto para su aislamiento como para su posterior cultivo (Ng *et al.*, 2014).

Para evaluar la importancia de la fuerza iónica en el medio de cultivo para el crecimiento y actividad de *S. arenicola*, se utilizó agua de mar (3.5%), agua de mar diluida hasta obtener una salinidad de 2.5% y agua de mar adicionando con NaCl para obtener una salinidad de 4.5%. En las tres diferentes concentraciones se logro el crecimiento de *S. arenicola*, y la morfología de la cepa presentó características morfológicas propias de la especie, color amarillo pálido en los primeros días de crecimiento y posteriormente color naranja brillante, después de 7 días de incubación (Maldonado *et al.*, 2005; Mincer *et al.*, 2005; Ng *et al.*, 2014). La cepa de *S. arenicola* estudiada pudo crecer a bajas salinidades, ya anteriormente se ha descrito *S. arenicola* tiene los menores requerimientos de iones para su crecimiento inicial, creciendo en conductividades menores con respecto a *S. tropica* y *S. pacifica* (Tsueng & Lam, 2010).

Estos factores tales como medio de cultivo, proceso de fermentación, concentración del agua de mar, pH y periodos de incubación resultan imperativos

de determinar en cada cepa para lograr la mayor producción de metabolitos antibacterianos de interés (Djini *et al.*, 2010). Por otro lado, la disponibilidad de micronutrientes, carbono y nitrógeno también estimulan la actividad enzimática, promoviendo la síntesis de metabolitos bioactivos (Gill *et al.*, 2003). En una revisión que se enfoca en las estructuras químicas reportadas con referencia a sus actividades biológicas y a través de la aplicación de estudios genómicos que se enfocaron en grupos de genes biosintéticos específicos. Estudios de secuenciación del género *Salinispora*, mostraron que un amplio porcentaje de los genes descritos, son utilizados para el proceso de síntesis de metabolitos secundarios (Duncan *et al.*, 2015). Los estudios de las secuencias genómicas de *Salinispora* revelaron una abundancia de policétido sintasa (PKS) y péptidos no ribosómicos péptido sintetasa (NRPS) (Udwary *et al.*, 2007).

Este género ha demostrado ser una fuente de compuestos con diversidad química, como es el caso de la síntesis de compuestos organohalogenados, dónde la incorporación de un átomo de un halógeno en una molécula puede resultar o mejorar una actividad biológica, también se conoce que en este género existe particularmente una correlación entre las especies y la clase de los compuestos producidos (Fenical & Jensen, 2007). En un estudio preliminar del perfil de compuestos químicos para *Salinispora arenicola* (cepa PA-Sa-33'-2) se hicieron presentes compuestos con naturaleza de fenoles, taninos, flavonoides, cumarinas, saponinas, y aminoácidos. Por otro lado, también se ha reportado el grupo de terpenos para este género, específicamente se ha descrito la producción de carotenoides, como rasgo fenotípico en el desarrollo vegetativo de la bacteria (Richter *et al.*, 2014), demostrando que el patrón genómico de biosíntesis de los carotenoides se conserva en todo el género (Jensen *et al.*, 2015). Este conjunto de genes identificados en *Salinispora* coincide con los encontrados en miembros del género *Streptomyces* (Takano *et al.*, 2005). Silva-Lacerda *et al.*, 2015 también reporta para el género *Streptomyces* triterpenos y flavonoides, estos últimos también se lograron identificar en *Salinispora arenicola* (cepa PA-Sa-33'-2).

En las pruebas de actividad antimicrobiana de los diferentes extractos de *S. arenicola* de las diferentes condiciones frente a las cepas patógenas de referencia *S. aureus* ATCCBAA-42 y *S. epidermidis* ATCC-12228, la actividad antibacteriana conforme al paso del tiempo de cultivo fue aumentando. Los extractos de los días 7 y 14 mostraron actividad, sin embargo, los extractos de los días 21 y 28 fueron las que presentaron la mayor actividad frente a las cepas patógenas, de las cuales *S. epidermidis* ATCC-12228 resultó ser más sensible a los extractos. La mayor actividad antibacteriana frente a *S. aureus* y *S. epidermidis* se presentó utilizando medio SYP, con halos de inhibición de 25.7 ± 0.5 mm y 25.3 ± 1.5 mm en una salinidad de 4.5% y 2.5% al cabo de 21 días respectivamente, utilizando una concentración de 100 μ g. Ng et al. (2014) mencionan que las condiciones de crecimiento bajas en sodio contribuyeron al menos a un aumento doble en la producción de rifamicina, observando a los 16 días se detecta este metabolito secundario, obteniendo la mayor concentración a los 38 días. Cepas aisladas de sedimentos marinos del Golfo de California mostraron actividad antibiótica contra *S. aureus* resistente a la meticilina (Torres-Beltrán et al., 2012). Asolkar et al. (2010) de igual manera evaluaron extractos crudos de *S. arenicola* aislada de la Isla Gran Bahama en el Océano Atlántico tropical, seis de los extractos evaluados mostraron una actividad biológica prometedora contra *S. aureus* resistente a la rifampicina y a la meticilina con una concentración mínima inhibitoria de 1.06 μ g/ml. Íñiguez-Martínez et al. (2016) también reportan una actividad positiva de cepas de *Salinispora* contra la bacteria *Klebsiella pneumoniae* y *S. aureus* con una mínima concentración inhibitoria ≤ 100 μ g/ml para ambos microorganismos. En comparación con nuestros resultados evaluando el extracto SYP- 4.5% - 21 días se obtuvo una mínima concentración inhibitoria de 1.52 μ g/ml.

La evaluación química de *S. arenicola* ha logrado la identificación y aislamiento de nuevos compuestos bioactivos, como es el caso de la salinisporamicina el cual presentó actividad citotóxica moderada contra la línea celular de cáncer de pulmón A549, y también mostró actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* con una

concentración mínima inhibitoria de 0.46 µg/ml (Matsuda *et al.*, 2009). Williams *et al.* (2007) realizó el fraccionamiento del extracto crudo de *S. arenicola* mediante cromatografía C18, obteniendo la fracción 4 (50% de CH₃CN / H₂O) a partir de la cual aislaron tres compuestos, arenicolide A, B y C, aunque estos no presentaron actividad frente a *S. aureus* multidrogo resistente ni a *E. faecium* resistente a la vancomicina.

En el presente estudio se logró identificar al ácido fenilacético como producto mayoritario en los extractos y fracciones, este compuesto es abundante en la naturaleza y es conocido como precursor en la producción de metabolitos secundarios de interés farmacéutico (Marinelli & Molinari, 2012). Se forma por transformación aeróbica o anaeróbica, de compuestos tales como: los aminoácidos fenilalanina y tirosina (Mohamed *et al.*, 1993). El ácido fenilacético ha tenido aplicación en la medicina, por sus propiedades antitumorales y como un efectivo agente antimicrobiano (Somers *et al.*, 2005). Kim *et al.*, (2004) lograron purificar ácido fenilacético, confirmando el amplio espectro antimicrobiano frente a *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginos* y en específico contra *S. aureus* y *S. epidermidis* en las pruebas antibacterianas. Estos autores probaron 100 µg en sensidiscos y no observaron inhibición del crecimiento de *S. aureus* y *S. epidermidis*, al incrementar la concentración a 250 µg obtuvieron una inhibición de 10.3 ± 0.6 mm y 9.7 ± 0.6 mm respectivamente.

Otro compuesto que se identificó en los extractos y fracciones fue el uracilo, que es conocido que forma parte de las cuatro bases nitrogenadas del ARN. Esta base nitrogenada es precursora en la biosíntesis de metabolitos secundarios formados por una serie de reacciones consecutivas, catalizadas a partir de intermediarios bioquímicamente simples del metabolismo primario que se derivan de rutas del metabolismo primario, como la glucólisis, el ciclo de Krebs o la vía del shikimato (Sepúlveda *et al.*, 2003)

9. CONCLUSIONES

El crecimiento de *S. arenicola* varía de acuerdo a las condiciones de cultivo, en el medio GYM (Glucosa y Malta) con salinidad de 3.5% se obtuvo el mejor crecimiento reflejado en un volumen de paquete celular mayor, aún cuando la fase de adaptación es más lenta con respecto a las salinidades de 2.5 y 4.5%.

La composición en el medio de cultivo también afecta la curva de crecimiento de *S. arenicola*, con el medio SYP, que contiene almidón como fuente de carbono y peptona como fuente de nitrógeno existe mayor fluctuación en las etapas de crecimiento. Mientras que con el medio GYM (Glucosa, Levadura, Malta) las fases de adaptación, exponencial y estacionaria se encuentran bien definidas.

La salinidad es un factor importante para la expresión de la actividad antibacteriana. Si bien a una salinidad de 3.5% se obtiene el mayor crecimiento de *S. arenicola*, la actividad de la cepa no fue significativa. Mientras que en salinidades de 2.5 y 4.5% que producen un stress en el crecimiento de *S. arenicola*, la actividad antibacteriana frente a *S. aureus* y *S. epidermidis* se incrementó considerablemente, inhibiendo a las bacterias patógenas a bajas concentraciones.

Con respecto a los días de cultivo, de manera general a los 21 días se incrementa la actividad de los extractos. El análisis del perfil químico de los extractos más activos mostró variaciones y fue precisamente a los 21 días de cultivo cuando se observa la presencia de diferentes clases de compuestos.

A partir de las fracciones de los extractos más activos, se lograron identificar dos compuestos, el uracilo y el ácido fenilacético, los cuales son precursores de la biosíntesis de metabolitos secundarios antibacterianos.

10. RECOMENDACIONES

Debido a que las condiciones de cultivo que propiciaron una mayor actividad, el crecimiento de *S. arenicola* fue bajo y por ende el rendimiento de extracción, se requiere realizar cultivos a mayor escala que permitan realizar el fraccionamiento y aislamiento de compuestos responsables de la actividad frente a las cepas patógenas evaluadas.

11. REFERENCIAS

- Asolkar, R.N., Kirkland, T. N., Jensen, P. R., & W. Fenical. 2010. Arenimycin, an antibiotic effective against rifampin-and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *The Journal of antibiotics*, 63(1): 37.
- Baños-Zamora, M., E. D. Somonte-Zamora. V. Morales-Pérez. 2015. Infección nosocomial. Un importante problema de salud a nivel mundial. *Rev. Latinoam. Patol. Clin. Med. Lab.*, 62 (1): 33-39.
- Becerril-Espinosa, A. 2011. Actinobacterias aisladas del sedimento marino del Golfo de California y de Bahía Todos Santos: diversidad, bioactividad y dominios cetosintetasa. 2011. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Baja California.
- Becerril-Espinosa, A., Freel, K.C., P. R. Jensen & I. E. Soria-Mercado. 2013. Marine actinobacteria from the Gulf of California: diversity, abundance and secondary metabolite biosynthetic potential. *Antonie van Leeuwenhoek*, (103):809–819.
- Bose U, A. K. E. M. Hewavitharana, K. P. Vidgen, Ng, P. N. Shaw & J. A. Fuerst. 2014. Discovering the Recondite Secondary Metabolome Spectrum of *Salinispora* Species: A Study of Inter-Species Diversity. *PLoS ONE* 9:3 e91488.
- Blunt, J. W., V. L. Calder, G. D. Fenwick, R. J. Lake, J. D. McCombs, M. H. Munro, & N. B. Perry. 1987. Reverse Phase Flash Chromatography: A Method for the

- Rapid Partitioning of Natural Products Extracts. *Journal of Natural Products*, 50(2): 290-292.
- Cardoso-Martínez, F., A. Becerril-Espinosa, C. Barrila-Ortíz, M. Torres-Beltrán, H. Ocampo-Alvarez, A. M. Iñiguez-Martínez, & I. E. Soria-Mercado. 2015. Antibacterial and cytotoxic bioactivity of marine Actinobacteria from Loreto Bay National Park, Mexico. *Hidrobiológica*, 25(2): 223-229.
- Cartuche-Flores, L. E. 2013. Aislamiento de metabolitos secundarios bioactivos de una especie bacteriana marina del género *Streptomyces*. Memoria de Investigación Master en Química. Universidad de La Laguna, España, pág:1-88.
- Djinni, I., A. Defant, M. Kecha & I. Mancini. 2013. Antibacterial polyketides from the marine alga-derived endophytic *Streptomyces sundarbansensis*: a study on hydroxypyron tautomerism. *Marine drugs*, 11(1): 124-135.
- Duncan K.R., C. Max, A. Lechner, A. Sarkar, J. Li, N. Ziemert, M. Wang, N. Bandeira, B. S. Moore, P. C. Dorrestein & P. R. Jensen. 2015. Molecular Networking and Pattern-Based Genome Mining Improves Discovery of Biosynthetic Gene Clusters and their Products from *Salinispora* Species. *Chemistry & Biology*, 22: 460–471.
- Richter T.K, C. C. Hughes & B. S. Moore. 2014. La sioxantina, un nuevo carotenoide glicosilado, revela una inusual vía biosintética subclusterizada. *Microbiología ambiental*, 17 (6): 2158-71.
- Fenical, W. & P. R. Jensen. 2006. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nature chemical biology*, 2(12): 666-673.
- Ferreira-Torres, M. A. 2012. Diseño y optimización de un medio de cultivo para tres aislamientos de actinobacterias aisladas de suelos colombianos potenciales promotoras de crecimiento vegetal (PGPR). Tesis De Licenciatura. Bogotá, D.C.

- Gill, P.K, A. Sharma, R. Harchand & P. Sigh. 2003 Effect of media supplements and culture conditions on inulinase production by an actinomycete strain. *Bioresource Technology*, 87: 359- 362.
- Harborne, J. B. 1998. *Phytochemical Methods: A guide to modern techniques of plant analysis*. Chapman and Hall, London.
- Íñiguez-Martínez, A. M., F. Cardoso-Martínez, J. de la Rosa, M. Cueto, A. Díaz Marrero, J. Darias, & I. E. Soria-Mercado, 2016. Compuestos aislados de *Salinispora arenicola* del Golfo de California, México. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 51(1):161-170.
- Jensen, P. R. & W. Fenical. 1994. Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: Ecological perspectives. *Annu Rev Microbiology*, 48(1): 559-84.
- Jensen, P. R., P. Q, Williams., Oh, D. C., L, Zeigler. & W. Fenical. 2007. Species-specific secondary metabolite production in marine actinomycetes of the genus *Salinispora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(4): 1146-1152.
- Jensen, P.R., S.B. Moore & W. Fenical. 2015. The marine actinomycete genus *Salinispora*: a model organism for secondary metabolite discovery. *Natural Products Reports* 32: 738.
- Kempf, B. & E. Bremer. 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol.*, 170: 319– 330.
- Kurtböke D.İ., T. Grkovic & J. Quinn. 2015. Marine Actinomycetes in Biodiscovery. In: Kim SK. (eds) *Springer Handbook of Marine Biotechnology*. Springer Handbooks. Springer, Berlin, Heidelberg
- Kim, Y., J. Y. Cho, J. H. Kuk, J. H. Moon, J. I. Cho, Y. C. Kim & K. H. Park . 2004. "Identification and antimicrobial activity of phenylacetic acid produced by *Bacillus licheniformis* isolated from fermented soybean, Chungkook-Jang." *Curr Microbiol.*, 48(4): 312-7.

- León, M., L. Liza, I. Soto, D. L. Cuadra, L. Patiño, & R. Soto. 2007. Actinomicetos bioactivos de sedimento marino de la costa central del Perú. *Revista Peruana de Biología*, 14(2): 259-270.
- López-Herrera, J. R., A. F. Méndez-Cano, R. I. Bobadilla-Espinosa, J. Zacate-Palacios. 2012. Infecciones nosocomiales, mortalidad atribuible y sobre estancia hospitalaria. *Rev. Enferm. Inst. Mex. Seguro Soc.*, 20 (2): 85-90.
- Maldonado, L. A., W. Fenical, P. R. Jensen, C. A. Kauffman, T. J. Mincer, A. C. Ward, A. T. Bull & M. Goodfellow. 2005. *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family Micromonosporaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(5):1759-1766.
- Maldonado, L. A., D. Fragosó-Yáñez, A. Pérez-García, J. Rosellón-Druker, & E. T. Quintana. 2009. Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 95(2): 111-120.
- Magarvey, N. A., J. M. Keller, V. Bernan, M. Dworkin & D. H. Sherman. 2004. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxon rich in bioactive metabolites. *Appl Environ Microbiol.*, 70(12): 7520-9.
- Marinelli, F. & F. Molinari. 2012. Las fermentaciones en la producción de metabolitos secundarios de interés farmacéutico. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia.
- Matsuda, S., Adachi, K., Matsuo, Y., Nukina, M., & Shizuri, Y. 2009. Salinisporamycin, a novel metabolite from *Salinispora arenicola*. *The Journal of antibiotics*, 62(9): 519.
- Mincer, T. J., P. R. Jensen, C. A. Kauffman & W. Fenical. 2002. Widespread and Persistent Populations of a Major New Marine Actinomycete Taxon in Ocean Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10): 5005-5011.
- Mohamed, M. E., B. Seyfried, A. Tschech y G. Fuchs (1993). "Anaerobic oxidation of phenylacetate and 4-hydroxyphenylacetate to benzoyl-coenzyme A and CO₂ in denitrifying *Pseudomonas* sp. Evidence for an alpha-oxidation mechanism." *Arch Microbiol* 159(6): 563-73.

- Morrow, N., C. A. Ramsden, B. J. Sargent & C. D. Wallett. 1998. Oxidative decarbonylation of β -arylpyruvic acids using sodium perborate. *Tetrahedron*, 54(33): 9603-9612.
- Ng, Y. K., M. P. K. Hodson, Hewavitharana, A. K., Bose, U., Shaw, P. N., & Fuerst, J. A. 2014. Effects of salinity on antibiotic production in sponge-derived *Salinispora* actinobacteria. *Journal of applied microbiology*, 117:1:109-125.
- Ng, Y. K., Hewavitharana, A. K., Webb, R., Shaw, P. N., & Fuerst, J. A. 2013. Developmental cycle and pharmaceutically relevant compounds of *Salinispora* actinobacteria isolated from Great Barrier Reef marine sponges. *Applied microbiology and biotechnology*, 97:7, 3097-3108.
- Rathnayake, G. N., Kumar, N. S., Jayasinghe, L., Araya, H., & Fujimoto, Y. 2018. Chemical investigation of metabolites produced by an endophytic fungi *Phialemonium curvatum* from the leaves of *Passiflora edulis*. *Natural product research*, 32(20), 2483-2486.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2018. Una atención más limpia es una atención más segura. Recuperado de <https://www.who.int/gpsc/background/es/>.
- Schneemann, I., Kajahn, I., Ohlendorf, B, Zinecker, H., Erhard, A., Nagel, K., Wiese, J. & J.F. Imhoff. 2010. Mayamycin, Cytotoxic Polyketide from a *Streptomyces* Strain Isolated from the Marine Sponge *Halichondria panicea*. *Journal of Natural Products*, 73(7): 1309-1312.
- Sepúlveda-Jiménez, G., Porta-Ducoing, H., y Rocha-Sosa, M. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21:355-363.
- Silva-Lacerda, G. R., Santana, R. C. F., Vicalvi-Costa, M. C. V., Solidônio, E. G., Sena, K. X. F. R., Lima, G. M. S., & Araújo, J. M. 2015. Antimicrobial potential of actinobacteria isolated from the rhizosphere of the Caatinga biome plant *Caesalpinia pyramidalis* Tul. *Genetics and Molecular Research*, 15(1): 15017488
- Somers, E., D. Ptacek, P. Gysegom, M. Srinivasan & J. Vanderleyden. 2005. *Azospirillum brasilense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the

- key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis. *Applied and environmental microbiology*, 71:4, 1803-1810.
- Takano H, Obitsu S, Beppu T, Ueda K. Carotenogénesis inducida por la luz en *Streptomyces coelicolor* A3 (2): Identificación de un factor sigma de función extracitoplásmica que dirige la transcripción fotodependiente del grupo de genes de biosíntesis de carotenoides. 2015. *J. Bacteriol*, 187: 1825–1832.
- Tinh, T.H., T. Nuidate, V. Vuddhakul, C. Rodkhum, L. Nunan, R. Redman, L. Mohney, C. Pantoja, K. Fitzsimmons & D. Lightner. 2016. Antibacterial Activity of Pyrogallol, a Polyphenol Compound Against *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from The Central Region of Thailand. *Procedia Chemistry*, 18: 162–168.
- Torres-Beltrán, M., F. Cardoso-Martínez, N. Millán-Aguiñaga, A. Becerril-Espinosa, & I. E. Soria-Mercado. 2012. Evaluación del golfo de California como una fuente potencial de actinobacterias marinas bioactivas. *Ciencias marinas*, 38(4):609-624.
- Tsueng, G. & K. S, Lam. 2010. A preliminary investigation on the growth requirement for monovalent cations, divalent cations and medium ionic strength of marine actinomycete *Salinispora*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 86:1525–153.
- Udwarý, D. W., L Zeigler, R. N. Asolkar., V. Singan, A. Lapidus, W. Fenical & B. S. Moore. 2007. Genome sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete *Salinispora tropica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104:25, 10376–10381.
- Van Keulen G, J. Siebring, L. Dijkhuizen. Central carbon metabolic pathways in *Streptomyces*. En: Dyson P. (eds.). *Streptomyces*, molecular biology and biotechnology. *Caister Academic Press*. 105-119.
- Waksman S. A. 1950. *The Actinomycetes: Their Nature, Occurrence, Activities, and Importance*. First edition. Chronica Botanica Company of Waltham. Mass., U.S.A. 266p.
- Williams, P. G., E. D. Miller, R. N. Asolkar, P. R. Jensen & Fenical, W. 2007. Arenicolides A– C, 26-Membered Ring Macrolides from the Marine

Actinomycete *Salinispora arenicola*. *The Journal of organic chemistry*, 72:14, 5025-5034.

Xiong Z, X. R. Tu & Q. R, Tu. 2008. Optimization of medium composition for actinomycin X2 production by *Streptomyces spp* JAU4234 using response surface Methodology. *Journal of Industrial Microbial Biotechnology*, 35: 729-734.