

UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL
VALPARAÍSO – CHILE



**ACTINOBACTERIAS MARINAS:
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y EXPLORACIÓN
DE SU POTENCIAL AMBIENTAL**

Vania Andrea Molina Cádiz

**MEMORIA DE TITULACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO CIVIL AMBIENTAL**

PROFESORES GUÍAS:

Dra. Beatriz Cámara

Dr. Henrik Hansen

DICIEMBRE, 2018

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer al Centro de Biotecnología “Daniel Alkalay Lowitt”, a todas las personas que lo componen, a la Dra. Beatriz Cámara por dejarme ser parte del desconocido mundo de la investigación y de su equipo, Actino Team. Sin ustedes este trabajo no hubiese sido posible y hubiese sido mucho más aburrido. Muchas gracias por el infinito apoyo, paciencia, risas y aprendizaje. Muchas gracias Agustina, por adoptarme y enseñarme con tanto amor.

A mis compañeros, gracias infinitas por ser parte de este largo viaje, gracias por reprobar ramos conmigo, por las eternas horas en biblioteca, los pancitos con queso, los carretes, las cañas y las conversaciones, porque hicieron que todos los problemas externos pasaran a secundario cuando estaba con ustedes, porque no hubiese terminado sin su ayuda, sus apuntes prestados y su apoyo, y porque son lo mejor que me dio la universidad, gracias por convertirse en familia.

A mis amigos de la vida, porque estos años me demostraron quienes se quedarán conmigo por siempre, gracias por estar ahí incondicionalmente. Gracias por perdonar mis ausencias y tener fe en mí cuando yo la perdía.

Finalmente, gracias a mi apoyo fundamental, mi familia. Gracias por todos los sacrificios que tuvieron que hacer por mí, por aguantarme en mis periodos de prueba (Naty y Lela), en las crisis existenciales y siempre creer que todo lo puedo lograr. Gracias especiales a mi mamá, porque viéndola ser una madre leona total me enseñó a confiar en mí misma y a saber que nadie puede destruir mis sueños. Por último, gracias a mi abuelita, porque su paso por mi vida me dejó tan llena de amor y fuerzas por siempre, y porque se que le hubiese encantado ver esto, comprarme un vestido y presumirle a sus amigas.

Muchas gracias a todos.

RESUMEN

La aparición de organismos patógenos resistentes a los antibióticos ha desencadenado uno de los mayores problemas de salud pública mundial. El uso inadecuado, la capacidad evolutiva de los microorganismos y la baja en la investigación farmacológica, ha provocado la urgente necesidad de buscar compuestos nuevos para combatir las enfermedades infecciosas.

El océano se caracteriza por su gran diversidad biológica y poseer ambientes únicos que lo convierten en un prospecto ideal para esta búsqueda. Los microorganismos que habitan en él se someten a condiciones únicas de presión ecológica que resulta en un gran potencial de producción de compuestos bioactivos. En particular, el *phylum Actinobacteria* se caracteriza por los productos metabólicos útiles que sintetizan y excretan. De los cuales muchos son antibióticos, agentes tumorales y agentes inmunodepresores.

En este estudio se evaluaron 9 cepas de actinobacterias raras pertenecientes a 7 géneros: *Aeromicrobium*, *Arthrobacter*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Curtobacterium*, *Kocuria* y *Microbacterium*. Provenientes de tres zonas de Chile: Valparaíso, Rapa Nui y Fiordo de Comau. Se realizaron pruebas de actividad antimicrobiana con extractos crudos utilizando 5 medios y 6 cepas modelo de interés clínico: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica*. También se incluyó una cepa de interés agrícola *Clavibacter michiganensis* para comprobar y ampliar el potencial de las actinobacterias. Las mayores inhibiciones se presentaron con los géneros *Arthrobacter*, *Brevibacterium* y *Curtobacterium*, contra las patógenas *Clavibacter michiganensis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Tres muestras de los extractos obtenidos, pertenecientes al Fiordo de Comau, fueron enviados a Fundación MEDINA para su análisis cromatográfico, con lo que se comprobó la posible presencia de compuestos novedosos.

Por otra parte, la contaminación ambiental por metales pesados presenta una problemática mundial que se hace evidente en las costas de Valparaíso. Al poseer un sector industrial ampliamente distribuido en el sector, se han generado episodios de intoxicación y contaminación de los productos del mar. Se determinó el potencial de las actinobacterias para la biorremediación de 6 metales pesados, Cobre (Cu), Cobalto (Co), Níquel (Ni), Arsénico (As), Cromo (Cr) y Mercurio (Hg), a través de ensayos con placas de agar diluidas con el metal en dos concentraciones. Se obtuvo crecimiento en todos los metales, excepto Mercurio. Los géneros que presentaron crecimiento en más metales fueron *Arthrobacter* y *Brevibacterium*.

De esta investigación se concluye el gran potencial que presentan las actinobacterias aisladas en Chile para diferentes aplicaciones tanto clínicas y agrícolas, produciendo compuestos bioactivos, como posible agente de descontaminación de metales pesados. Además, se revalida la importancia de investigar lugares poco explorados y géneros distintos a *Streptomyces*, ya que las cepas provenientes del Fiordo de Comau presentaron gran potencial en todas las pruebas realizadas.

ABSTRACT

The emergence of pathogenic organisms resistant to antibiotics has triggered one of the biggest public health problems in the world. The inadequate use, the evolutive capacity of the microorganisms and the low in the pharmacological investigation, has provoked the urgent need to look for new compounds to fight infectious diseases.

The ocean is characterized by its great biological diversity and unique environments that make it an ideal prospect for this search. Microorganisms that inhabit the ocean undergo unique conditions of ecological pressure that results in a great potential for the production of bioactive compounds. The *Actinobacteria* Phylum is characterized by the synthesis and excretion of useful metabolic products, many of which are used as antibiotics, tumor agents and immunosuppressive agents.

In this study, 9 strains of rare actinobacteria belonging to 7 genera were evaluated: *Aeromicrobium*, *Arthrobacter*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Curtobacterium*, *Kocuria* and *Microbacterium*. From three areas of Chile: Valparaíso bay, Rapa Nui and Comau fjord. Antimicrobial activity tests were performed with crude extracts using 5 culture media and 6 model strains of clinical interest: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella enterica*. A strain of agricultural interest *Clavibacter michiganensis* was also included to verify and expand the potential of the actinobacterias. The greatest inhibitions were found in the genera *Arthrobacter*, *Brevibacterium* and *Curtobacterium*, against the pathogens *Clavibacter michiganensis* and *Pseudomonas aeruginosa*. Three samples of the obtained extracts, belonging to strains from the Comau fjord, were sent to Fundación MEDINA for its chromatographic analysis, which proved the possible presence of novel compounds.

On the other hand, environmental contamination by heavy metals presents a global problem that is evident in the coasts of Valparaíso. By having a big industrial sector of intoxication and contamination episodes related to seafood products have been generated. The potential of actinobacteria was determined for the bioremediation of 6 heavy metals, Copper (Cu), Cobalt (Co), Nickel (Ni), Arsenic (As), Chromium (Cr) and Mercury (Hg), through tests with agar plates containing two different concentrations of the respective metal. Growth was obtained with all metals, except Mercury. The genera that showed growth in the presence of more metals were *Arthrobacter* and *Brevibacterium*.

In conclusion, this study shows the great potential of actinobacteria isolated in Chile for different clinical and agricultural applications, producing bioactive compounds, as well as a possible agent for decontamination of heavy metals. In addition, the importance of investigating unexplored places and genera other than *Streptomyces* is revalidated, since the strains from the Comau fjord presented great potential in all the tests performed.

Índice

Agradecimientos	II
RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
Índice	V
Índice de Figuras	VII
Índice de Tablas	VIII
1 Introducción y Objetivos	9
1.1 Introducción	9
1.2 Objetivos	11
Objetivo General	11
Objetivos Específicos	11
2 Marco Teórico	12
2.1 Diversidad en Ecosistemas Marinos	12
2.2 Microorganismos Marinos como fuente de Compuestos Bioactivos	13
2.3 <i>Phylum Actinobacteria</i>	15
2.3.1 Actinobacterias Marinas	16
2.3.2 Actinobacterias aisladas en Chile	17
2.3.3 Potencial Biotecnológico	20
2.3.3.1 Potencial de Producción de Compuestos Bioactivos	20
2.3.3.2 Potencial de Biodegradación de Metales Pesados	22
2.4 Resistencia Antimicrobiana	23
2.5 Agricultura	26
2.6 Contaminación por Metales Pesados en Océanos	27
2.6.1 Contaminación por Metales Pesados en Chile	31
3 Procedimiento Experimental	33
3.1 Selección de Cepas y Medios de Cultivo	33
3.1.1 Selección de Cepas	33
3.1.1.1 Actinobacterias no Streptomyces	33
3.1.1.2 Cepas no Streptomyces con actividad antimicrobiana	35
3.1.2 Medios de Cultivo	37

3.2	Producción de Compuestos Bioactivos.....	37
3.2.1	Fermentación de Actinobacterias.....	38
3.2.2	Ensayos de Actividad Antibacteriana con Extractos Crudos.....	38
3.3	Búsqueda de Nuevos Productos	40
3.4	Estudio de biorremediación de metales pesados.....	42
4	Resultados.....	43
4.1	Producción de Compuestos Bioactivos.....	43
4.1.1	Ensayos de Actividad Antibacteriana con Extractos Crudos.....	43
4.2	Búsqueda de Productos Naturales (PN).....	48
4.2.1	Resultados cepa <i>Arthrobacter</i> sp. H-JH3.....	49
4.2.2	Resultados cepa <i>Brevibacterium</i> sp. H-BE7.	50
4.2.3	Resultados cepa <i>Kocuria</i> sp. H-KB5.....	50
4.3	Estudio de resistencia de actinobacterias a metales pesados.....	51
5	Discusión	54
5.1	Potencial de Producción de compuestos Bioactivos	54
5.1.1	Producción en cepas del mismo género	56
5.1.2	Inhibición de <i>Clavibacter michiganensis</i> (CLMI)	58
5.1.3	Resultados <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PSAU)	59
5.2	Nuevos Productos Naturales	60
5.3	Potencial de Biorremediación de metales pesados.....	60
6	Conclusiones y Proyecciones	62
6.1	Conclusiones	62
6.2	Proyecciones	62
7	Referencias.....	63
8	Anexos.....	77
	Anexo A Soluciones y medios de cultivo	77
	Anexo B Equipos	80
	Anexo C Proyectos	80
	Anexo D Nomenclatura	81

Índice de Figuras

Figura 2-1 Variación en el número de nuevos productos marinos naturales entre 1985-2012....	14
Figura 2-2 Diversidad morfológica de actinobacterias	15
Figura 2-3 Sitios de Procedencia de Actinobacterias aisladas en Chile.....	18
Figura 2-4 Muertes al año atribuibles a la resistencia antimicrobiana para 2050.	24
Figura 2-5 Ejemplos de infección por <i>cmm</i> en tomate.....	27
Figura 2-6 Concentración de Mercurio en el Océano.	29
Figura 2-7 Concentración de metales en muestras de producto de mar tomadas por comuna [mg/kg].....	32
Figura 3-1 Diversidad de Actinobacterias presentes en el Laboratorio.	33
Figura 3-2 Diversidad de Actinobacterias en Valparaíso	34
Figura 3-3 Resultados positivos obtenidos por métodos de Cross Streak y Extractos Crudos. ...	35
Figura 4-1 Número y tipo de Actividades totales obtenidas por Cepa Modelo.	45
Figura 4-2 Número de actividades con resultado "+" y "++" por cepa.....	46
Figura 4-3 Porcentajes de actividades positivas por cepa modelo y medio de cultivo utilizado.	47
Figura 4-4 Ejemplos de halos de inhibición observados en los ensayos antimicrobianos con extractos crudos.	47
Figura 4-5 Cromatograma del Medio ISP-2/ASW.....	48
Figura 4-6 Cromatograma cep H-JH3.....	49
Figura 4-7 Forma Antibiotico cepa H-JH3	49
Figura 4-8 Cromatograma cep H-BE7	49
Figura 4-9 Cromatograma cep H-KB5.....	49
Figura 4-10 Ejemplos de crecimiento de cepas en MM/ASW.....	51
Figura 4-11 Resultados positivos obtenidos por metal y día estudiado.	52

Índice de Tablas

Tabla 2-1 Géneros de Actinobacterias aisladas en Chile.	19
Tabla 2-2 Ejemplos de compuestos bioactivos aislados de actinobacterias raras.	21
Tabla 3-1 Resultados previos de cepas escogidas.	36
Tabla 3-2 Criterios para análisis de resultados.	40
Tabla 3-3 Sales de metales utilizadas para medir potencial de biodegradación.	42
Tabla 3-4 Criterios de análisis de resultados.	43
Tabla 4-1 Criterios para análisis de resultados por extractos crudos.	44
Tabla 4-2 Resultados de Actividad Antimicrobiana con extractos crudos.	44
Tabla 4-3 Criterios análisis de resultados potencial de biodegradación metales pesados.	51
Tabla 4-4 Resultados de crecimiento de cepas con Metales Pesados.	53
Tabla 5-1 Comparación cepas VO30-3 y H-JH3	56
Tabla 5-2 Comparación cepas H-BE7 y Vc820	57
Tabla 5-3 Resultados contra CLMI	58
Tabla 5-4 Resultados contra PSAU	59
Tabla 8-1. Composición agua de mar artificial (ASW)	76
Tabla 0-2 Composición TSA	76
Tabla 8-3. Composición medio LB	77
Tabla 8-4. Composición medio ISP-2/ASW	77
Tabla 8-5. Composición medio ISP-2/ASW	77
Tabla 8-6. Composición medio SG	77
Tabla 8-7. Composición medio SM19	78
Tabla 8-8. Composición medio R5A ^b	78
Tabla 8-9. Composición Medio Mínimo	78
Tabla 8-10. Equipos	79
Tabla 0-11 Resumen Cepas utilizadas	80
Tabla 0-11 Cepas Modelo de Patógenas utilizadas	80

1 Introducción y Objetivos

1.1 Introducción

Hoy en día el mundo enfrenta una de las mayores problemáticas en la salud pública, la resistencia a los antimicrobianos. Cada vez hay más infecciones causadas por bacterias, parásitos, virus y hongos que ya no son susceptibles a los medicamentos comunes con los que se solía tratarlos. Este problema es especialmente urgente en relación con la resistencia a los antibióticos en las bacterias. Durante varias décadas, en diversos grados, las bacterias que causan infecciones han desarrollado resistencia a cada nuevo antibiótico que llega al mercado (Prestinaci *et al.*, 2015). Ante esta realidad, nace la necesidad de buscar nuevos compuestos que puedan ser utilizados como agentes antimicrobianos (World Health Organization, 2014).

Históricamente, los productos naturales de origen microbiano han sido una fuente rica de estructuras y hasta hoy, casi el 35% de todas las drogas se basan en estructuras de pequeñas moléculas naturales (Benndorf *et al.*, 2018). El *phylum Actinobacteria* destaca por ser responsable de producir aproximadamente el 70% de los antibióticos utilizados en la terapia humana, lo que los convierte en la fuente natural más robusta de éstos. Los antibióticos y otros compuestos únicos producidos por este *phylum* se conocen también como metabolitos secundarios (Behie *et al.*, 2016).

Con el objetivo de ampliar la búsqueda y posibilidades de encontrar nuevos compuestos, se ha desplazado la exploración a ecosistemas marinos. Estos representan uno de los hábitats más ricos y subexplotados con una gran diversidad microbiana que muestra el potencial para el descubrimiento de compuestos antimicrobianos novedosos (Hug *et al.*, 2018). Además de la búsqueda en nuevos ecosistemas, los descubrimientos de nuevos metabolitos naturales se centran actualmente en las actinobacterias raras. Llamadas así por pertenecer a géneros diferentes a *Streptomyces* y que se conocen como cepas que son difíciles de aislar y podrían corresponder a la fuente inigualable de nuevos metabolitos naturales (Azman *et al.*, 2015).

En este estudio se investiga el potencial de producción de compuestos bioactivos de actinobacterias raras provenientes de estos ecosistemas. Para esto, se trabajó con cepas

previamente aisladas de tres lugares de Chile: Fiordo de Comau, ubicado en la X región, e, Rapa Nui y Valparaíso, ambos lugares pertenecientes a la V región.

Con relación al último lugar nombrado, Valparaíso, y en específico la zona industrial de Quintero – Puchuncaví, se reconoce con uno de los problemas de contaminación ambiental más importantes a nivel nacional, relacionado con metales pesados, y otros conflictos. En los últimos años, ha habido una creciente preocupación ecológica y de salud pública asociada a los daños ambientales por estos metales. Esta contaminación es muy relevante en áreas como la mencionada, de fuentes puntuales como minería, fundiciones, y otras operaciones industriales basadas en metales (Tchounwou *et al.*, 2012).

En la actualidad, a pesar de haberse dado reiteradas emergencias por la mala calidad del aire y accidentes por mal manejo de actividades industriales, poniendo en riesgo a la población y sus diferentes actividades (como las intoxicaciones por gases tóxicos de niños y niñas de la escuela La Greda en los años 2011 y 2012 y los últimos 3 derrames de petróleo en la Bahía de Quintero), el problema persiste sin solución (Colegio Médico de Chile, 2018).

A partir de los antecedentes presentados, este estudio considera la evaluación del potencial de cepas de distintos lugares de Chile a través de ensayos antimicrobianos con patógenas cepas modelo de interés clínico y agrícola, y pruebas de biorremediación de metales pesados.

1.2 Objetivos

Objetivo General

Evaluar el potencial de actinobacterias marinas no miceliales para la producción de compuestos antibacterianos y de biorremediación de metales pesados.

Objetivos Específicos

- Seleccionar cepas marinas del *phylum Actinobacteria* distintos a *Streptomyces* con potencial actividad antibacteriana.
- Realizar fermentaciones de cepas seleccionadas con diferentes medios de cultivo para la producción de compuestos bioactivos.
- Evaluar la capacidad de producción de compuestos antibacterianos mediante ensayos antibacterianos con extractos crudos.
- Determinar el potencial de biorremediación de metales pesados con las cepas seleccionadas.

2 Marco Teórico

2.1 Diversidad en Ecosistemas Marinos

El océano constituye más del 70% de la superficie del planeta. Este entorno contiene más del 80% de la vida en la Tierra y presenta más de 300.000 especies de plantas y animales descritas (Donia and Hamann, 2003). Se estima que el número de especies desconocidas excede los 2 millones (Mora *et al.*, 2011).

La biodiversidad del ambiente marino se encuentra favorecida por las condiciones sublimes presentes. La presión ecológica a la que se expone: depredación, competencia por el espacio, contaminación, ha generado la aparición de metabolitos bioactivos únicos (Donia and Hamann, 2003). El hábitat específico donde crece un microorganismo tiene influencia en la naturaleza de estos metabolitos primarios y secundarios (Kiuru *et al.*, 2014). Un ejemplo de esto es la producción de metabolitos bioactivos como mecanismo de adaptación, ayudando a la supervivencia de los depredadores (Bhatnagar and Kim, 2010).

Las fuentes marinas también han demostrado enormes habilidades como productores de compuestos anticancerosos y metabolitos secundarios que actúan contra las enfermedades infecciosas y la inflamación (Bhatnagar and Kim, 2010). Las esponjas del ambiente marino (37%), los celenterados (21%) y los microorganismos (18%), son fuentes principales de compuestos biomédicos, seguidos de algas (9%), equinodermos (6%), tunicados (6 %), moluscos (2%) briozoos (1%), etc. (Blunt *et al.*, 2004). Sin embargo, y pese a su abundancia (una columna de agua de los océanos contiene aproximadamente 106 células bacterianas por mililitro (Debbab *et al.*, 2010)), a los microorganismos marinos no se les ha prestado la atención necesaria, y hasta la fecha se dispone de una visión muy limitada de las capacidades y de su potencial bioactivo.

A diferencia de los macroorganismos, los microorganismos representan fuentes prometedoras de productos naturales que tienen la ventaja de una producción factible y sostenible de grandes cantidades de metabolitos secundarios a un costo razonable, mediante el cultivo a gran escala y la fermentación del microorganismo fuente (Debbab *et al.*, 2010).

El océano muestra dos dominios claramente diferenciados: el agua y el sedimento. Ambos se contrastan de gran manera en términos de propiedades físicas, químicas y biológicas. El agua de

mar se caracteriza por una fuerte mezcla física debido a las corrientes y tormentas, un estado de nutrientes variable y la presencia de microbios ampliamente distribuidos y diluidos. En contraste, la mayor parte del mundo del fondo oceánico consiste en entornos menos dinámicos (Zinger *et al.*, 2011). Uno y otro están conectados a través de la sedimentación de la materia orgánica producida en la superficie.

Desde la temperatura y la disponibilidad de materia orgánica con el aumento de la profundidad del agua, han sido identificados como factores importantes que determinan la distribución vertical y estratificación de comunidades microbianas (Zinger *et al.*, 2011). Hasta ahora la mayoría de los estudios se han centrado en la zona fotosintéticamente productiva, que representa menos del 10% del volumen total de agua en el océano.

Los sedimentos marinos son hábitats que albergan diversas comunidades bacterianas y representa uno de las biomasas más grandes del planeta. Se ha demostrado que la diversidad microbiana en los sedimentos varía con los parámetros ambientales tales como la estacionalidad y la contaminación antropogénica; sin embargo, los principales impulsores de la composición de la comunidad siguen siendo en gran parte desconocidos (Patin *et al.*, 2017).

2.2 Microorganismos Marinos como fuente de Compuestos Bioactivos

En los organismos, vivos el metabolismo primario es el encargado de la biosíntesis y la descomposición de sustancias esenciales como las proteínas, grasas, ácidos nucleicos y carbohidratos. El metabolismo secundario es el responsable de producir compuestos que generalmente no son esenciales para el crecimiento, desarrollo o reproducción de un organismo y se producen como resultado de la adaptación al entorno o para actuar como un posible mecanismo de defensa contra los depredadores para ayudar a la supervivencia (Demain and Fang, 2000). Estos compuestos se conocen también como *compuestos bioactivos*, y se encuentran a menudo como exclusivo de un organismo o es una expresión de la individualidad de una especie (Dias *et al.*, 2012).

El uso de productos naturales en la medicina se remonta a miles de años. En el siglo XIX y principios del XX, se utilizó aceite de hígado de bacalao como suplemento nutricional. Sin embargo, solo se comenzó a explorar los océanos de forma sistemática a partir de 1985, en busca

de nuevas drogas. Debido a la peculiaridad del entorno marino, los compuestos bioactivos marinos generalmente tienen estructuras químicas únicas y una alta actividad biológica. Las nuevas estructuras y vías de metabolismo, así como las actividades biológicas de estos compuestos, son interesantes para el desarrollo de fármacos (Hu *et al.*, 2015).

En la década del 1990 el número aumentó y se mantuvo en un nivel constante de alrededor de 500 (Romano *et al.*, 2017). Desde el año 2008, más de 1000 compuestos son descubiertos cada año y el 60% de las drogas actualmente en el mercado son de origen natural (Newman and Cragg, 2012) (Ver Figura 2-1).

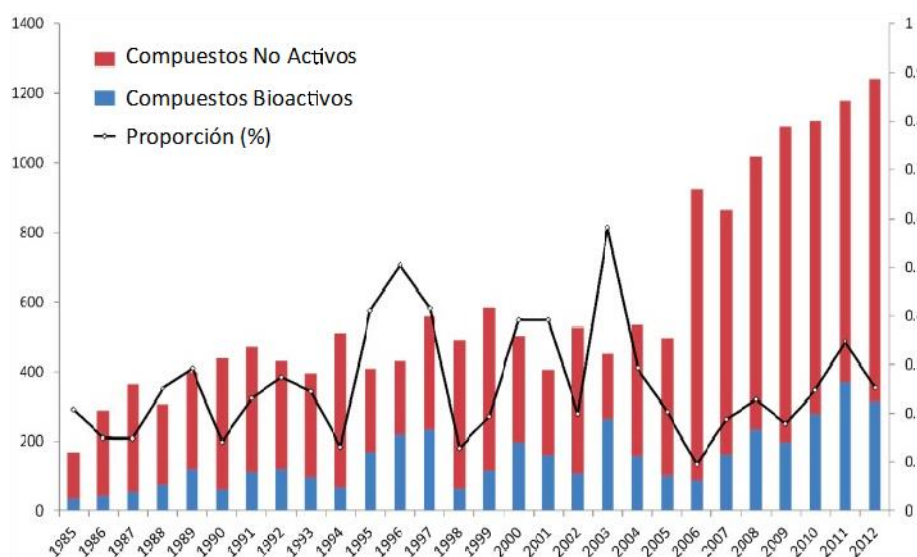


Figura 2-1 Variación en el número de nuevos productos marinos naturales entre 1985-2012, donde la proporción representa el número de compuestos bioactivos descubiertos por cantidad de compuestos totales. (adaptado de Hu *et al.*, 2015)

Con la exploración continua del medio ambiente marino, la atención se ha dirigido a microorganismos como cianobacterias marinas, hongos marinos y varios otros grupos de bacterias marinas debido a su diversidad biológica y de hábitat, dando como resultado la capacidad de producir metabolitos con estructuras incomparables (Martins *et al.*, 2014).

2.3 *Phylum Actinobacteria*

El *phylum Actinobacteria* representa una de las unidades taxonómicas más grandes dentro del dominio Bacteria (Ventura *et al.*, 2007). Se encuentra dividido en 6 clases, 23 órdenes y 53 familias (Ludwig *et al.*, 2012). El *phylum* se compone de una abundante cantidad de organismos fenotípicamente diversos, con amplia distribución en la naturaleza y que exhiben necesidades variadas de oxígeno, nutrición, temperatura y pH para el crecimiento, lo que lo convierte en un *phylum* importante (Polkade *et al.*, 2016). La mayoría de las actinobacterias son organismos de vida libre que están ampliamente distribuidos en ecosistemas terrestres y acuáticos, incluidos los ecosistemas marinos, aéreos y extremos (Goodfellow and Williams, 1983; Barka *et al.*, 2016).

Las actinobacterias son bacterias filamentosas Gram-positivas con un alto contenido de guanina más citosina (G + C) en sus genomas (>50%) (Gao and Gupta, 2012). Las morfologías de las especies de este *phylum* varían desde cocoides o varillas cocoides hasta formas de hifas fragmentadas o micelios ramificados altamente diferenciados (Ventura *et al.*, 2007) (Ver Figura 2-2).

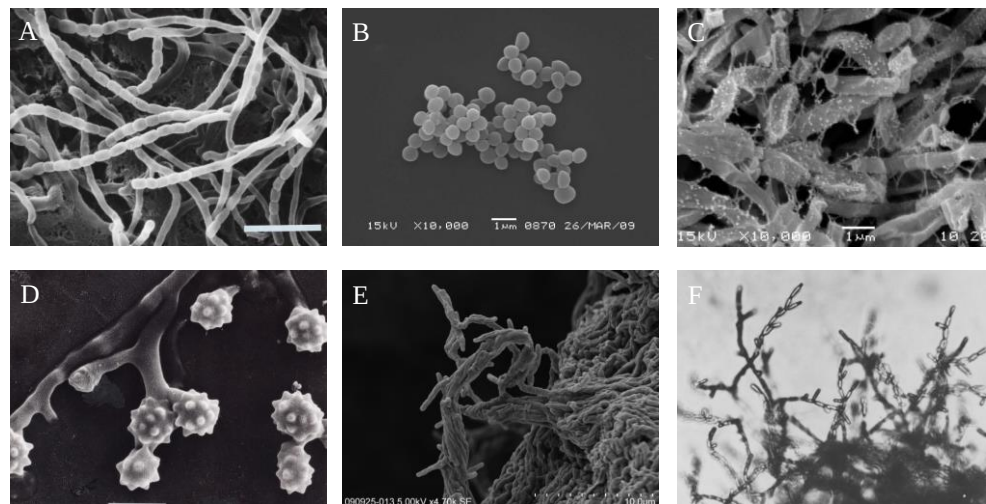


Figura 2-2 Diversidad morfológica de actinobacterias. A) *Streptomyces acuosus*; formación de cadenas rectas de esporas. B) *Luteimicrobium subarcticum*; células en forma de cocos sin movimiento. C) *Pseudonocardia acaciae*; cadenas de esporas con una superficie espinosa. D) *Micromonospora olivasterospora*; las esporas son transmitidas por esporóforos cortos. E) *Nocardia kruczakiae*, espora, tipo de micelio. Las hifas aéreas se enredan entre sí. F) *Pseudonocardia spinosa*; prolongación de toda la hifa esporulada. (Fuente: <http://www.actino.jp/DigitalAtlas>)

Los miembros del *phylum Actinobacteria* son contribuyentes importantes en el proceso de descomposición de la biomasa vegetal. Algunas actinobacterias son simbiontes generalizados de eucariotas, que ayudan a los herbívoros a obtener acceso a la biomasa vegetal como mutualistas nutricionales y a producir productos naturales como mutualistas defensivos (Lewin *et al.*, 2016).

Las especies de este grupo también exhiben una enorme diversidad fisiológica, como lo demuestra su producción de numerosas enzimas extracelulares y miles de productos metabólicos útiles que sintetizan y excretan en su medio. Muchos de estos productos metabólicos se han utilizado como antibióticos, agentes tumorales y agentes inmunosupresores (Bérdy, 2005; Gao and Gupta, 2012).

El género *Streptomyces*, en particular, ha producido varios compuestos bioactivos importantes, incluidos antibióticos, herbicidas biológicos y enzimas, todos los cuales poseen un alto valor comercial. De hecho, casi dos tercios de los antibióticos conocidos hoy en día se han obtenido desde *Streptomyces* (Nithya *et al.*, 2018). El problema con este género es que al ser sencillo de aislar y cultivar (es una de las especies más dominantes en las colecciones de cultivos de todo el mundo (Tiwari and Gupta, 2012)), es difícil encontrar compuestos bioactivos novedosos, más aún al saber que muchas *Streptomyces* terrestres frecuentan el intercambio genético entre éstas (Bredholdt *et al.*, 2007).

Con esta tendencia a la baja en el descubrimiento de nuevos compuestos, ha aumentado la necesidad de que se investiguen los hábitats no explorados, con el fin de identificar nuevas cepas de actinobacterias y compuestos bioactivos (Nithya *et al.*, 2018).

La investigación de la mayor cantidad de géneros, especialmente aquellos que han sido aislados en raras ocasiones, podría ser crucial para el éxito de descubrimiento de nuevos fármacos (Tiwari & Gupta, 2012). Se cree que los hábitats no y poco explorados, incluidos los ecosistemas marinos, son fuentes ricas de tales actinobacterias raras, con un enorme potencial para producir compuestos interesantes nuevos (Dhakal *et al.*, 2017).

2.3.1 Actinobacterias Marinas

Las actinobacterias se asocian comúnmente como habitantes de suelo. A través del tiempo, ha quedado claro que las actinobacterias comunes que habitan en el suelo pueden recuperarse

fácilmente a partir de muestras marinas (especialmente muestras recolectadas en las costas). La existencia oficial de distintas poblaciones marinas se hizo evidente en 1984 con la descripción taxonómica de la primera actinobacteria marina, *Rhodococcus marinonascens* sp. (Fenical and Jensen, 2006). Las actinobacterias marinas viven en forma de unas pocas colonias, la mayoría de las cuales no pueden crecer en condiciones de laboratorio. De hecho el género de *Salinispora*, requiere obligatoriamente agua de mar para su desarrollo (Maldonado *et al.*, 2005). La inmensa diversidad de actinobacterias marinas ha quedado en evidencia con los inventarios y estimaciones de diversidad filogenética según el gen 16S ARNr y los enfoques de cultivo. Con frecuencia están presentes en los sedimentos del fondo, pero rara vez constituyen más del 10% de la microflora viviente.

La mayoría de los representantes de actinobacterias se pueden aislar de costas, aguas costeras, sedimentos del fondo, peces, moluscos, esponjas, algas marinas y manglares (Manivasagan *et al.*, 2014). Los sedimentos de aguas profundas contienen >1300 unidades taxonómicas operativas diferentes de actinobacterias, una gran proporción de las cuales se predice que representan nuevas especies y géneros (Bull and Stach, 2007). Muchos aislamientos de actinomicetos de los océanos profundos contienen rutas de policétido sintetasa (NRPS) y policétido sintetasa (PKS) no ribosómicas, los sellos distintivos de la producción de metabolitos secundarios (Solanki *et al.*, 2008).

2.3.2 Actinobacterias aisladas en Chile

El territorio de Chile se encuentra en el extremo sur de América y posee una longitud de aproximadamente 4.300 kilómetros de norte a sur, la que se incrementa a 8.000 kilómetros, si se considera el Territorio Antártico Chileno. Su ancho promedio es de 180 kilómetros. Chile es un país tricontinental, pues posee territorio en el continente americano, incluyendo las islas del archipiélago Juan Fernández, isla San Félix e isla San Ambrosio; en Oceanía, a través de la isla de Salas y Gómez, y Rapa Nui; y en la Antártica, a través del Territorio Chileno Antártico.

Un rasgo distintivo del territorio chileno corresponde a su insularidad. Es un fenómeno resultante de las “barreras” naturales propias de su geografía. Por un lado, tenemos en el norte una zona desértica que se ubica entre las regiones de Tarapacá y Atacama. También existe una

barrera física ofrecida por la presencia a lo largo de casi toda la extensión, de la cordillera de los Andes, con una altura variable que disminuye de norte a sur. Finalmente, está el Océano Pacífico que también se distribuye a lo largo del territorio continental e insular (Santibáñez, Roa and Santibáñez, 2008). Estas características físicas otorgan a Chile la condición de Isla Biogeográfica. Esto permite una dotación de una gran diversidad de ecosistemas terrestres, marinos, costeros, glaciares, ríos, lagos, humedales y ecosistemas insulares, los que en su conjunto se estima que albergan cerca de 30.000 especies de plantas, animales, hongos y bacterias. A esto se suma un alto grado de endemismo de especies (22 a 25%), que transforman amplios espacios de nuestro territorio en verdaderos laboratorios naturales (Ministerios de Medio Ambiente, 2014) y que tiene prioridad mundial de conservación (Jorquera-Jaramillo et al., 2012).



Figura 2-3 Sitios de Procedencia de Actinobacterias aisladas en Chile 1) Géiser del Tatio (Okoro *et al.*, 2009; González, 2015) 2) Valle de la Luna (Okoro *et al.*, 2009) 3) Salar de Atacama (Okoro *et al.*, 2009) 4) Caleta Chañaral de Aceituno (Cumsille, 2015) 5) Rapa Nui (Vézina, Kudelski and Sehgal, 1975; Rojas, 2016) 6) Bahía de Valparaíso (Claverías *et al.*, 2015; González, 2015) 7) Lago Riñihue, Lago Tarahuín, Lago Natri y Lago Tepuhueico (Leiva P *et al.*, 2004) 8) Huinay (Undabarrena, Beltrametti, Fernanda P. Claverías, *et al.*, 2016) 9) Antártica (Leiva *et al.*, 2015; Lamilla *et al.*, 2018)

Tabla 2-1 Géneros de Actinobacterias aisladas en Chile.

Lugar	Géneros aislados	Referencia
Géiser del Tatio, Salar de Atacama, Valle de la Luna	<i>Amycolatopsis</i> sp., <i>Brachybacterium</i> sp., <i>Brevibacterium</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Dietzia</i> sp., <i>Gordonia</i> sp., <i>Knoellia</i> sp., <i>Lechevalieria</i> sp., <i>Microbacterium</i> sp., <i>Nocardia</i> sp., <i>Streptomyces</i> sp.	(Okoro <i>et al.</i> , 2009; González, 2015)
Caleta Chañaral de Aceituno	<i>Blastococcus</i> sp., <i>Brachybacterium</i> sp., <i>Brevibacterium</i> sp., <i>Dietzia</i> sp., <i>Gordonia</i> sp., <i>Janibacter</i> sp., <i>Kocuria</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., <i>Nocardioides</i> sp., <i>Nocardioopsis</i> sp., <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Streptomyces</i> sp.	(Cumsille, 2015)
Rapa Nui	<i>Streptomyces</i> sp., <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Brachybacterium</i> sp., <i>Brevibacterium</i> sp., <i>Knoellia</i> sp., <i>Kocuria</i> sp., <i>Kytococcus</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., <i>Nesterenkonia</i> sp., <i>Nocardioides</i> sp., <i>Rhodococcus</i> sp. y <i>Serinicoccus</i> sp.	(Vézina, Kudelski and Sehgal, 1975; Rojas, 2016)
Valparaíso	<i>Actinomadura</i> sp., <i>Aeromicrobium</i> sp., <i>Agrococcus</i> sp., <i>Arthrobacter</i> sp. <i>Brachybacterium</i> sp., <i>Brevibacterium</i> sp., <i>Clavibacter</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Dietzia</i> sp., <i>Flaviflexus</i> sp., <i>Gordonia</i> sp., <i>Isopterocola</i> sp., <i>Janibacter</i> sp., <i>Microbacterium</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Nocardioopsis</i> sp., <i>Ornithinimicrobium</i> sp., <i>Pseudonocardia</i> sp., <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Salinactinospora</i> sp., <i>Salinibacterium</i> sp., <i>Streptomyces</i> sp., <i>Tessarococcus</i> sp.	(Claverías <i>et</i> <i>al.</i> , 2015; González, 2015)
Fiordo de Comau	<i>Arthrobacter</i> sp., <i>Brachybacterium</i> sp., <i>Brevibacterium</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Curtobacterium</i> sp., <i>Dietzia</i> sp., <i>Kocuria</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Streptomyces</i> sp.	(Undabarrena <i>et al.</i> , 2016)

Lago Natri,		
Lago Riñihue,	<i>Streptomyces</i> sp., <i>Micromonospora</i> sp.,	(Leiva P <i>et al.</i> ,
Lago Tarahuín,	<i>Mycropolyspora</i> sp.	2004)
Lago Tepuhueico		
	<i>Agrococcus</i> sp., <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Brachybacterium</i>	
	sp., <i>Citricoccus</i> sp., <i>Kocuria</i> sp., <i>Labeledella</i> sp.,	(Leiva <i>et al.</i> ,
Antártica	<i>Microbacterium</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., <i>Rhodococcus</i>	2015; Lamilla
	sp., <i>Salinibacterium</i> sp., <i>Sanguibacter</i> sp.,	<i>et al.</i> , 2018)
	<i>Streptomyces</i> sp.	

2.3.3 Potencial Biotecnológico

La biotecnología consiste en la utilización de la maquinaria biológica de otros seres vivos de forma que resulte en un beneficio para el ser humano, ya sea porque se obtiene un producto valioso o porque se mejora un procedimiento industrial.

El *phylum Actinobacteria* se caracteriza por sus aplicaciones biotecnológicas, consecuencia de la gran diversidad metabólica de estos organismos y su larga asociación con el medio ambiente. Este grupo es un potencial productor de sustancias antimicrobianas, inhibidores de enzimas, inmunomodificadores, enzimas y sustancias promotoras del crecimiento para plantas y animales (Dilip and Mohalkar, 2013). Esto los convierte los procariotas más valiosos desde el punto de vista económico y biotecnológico (Lam, 2006).

2.3.3.1 Potencial de Producción de Compuestos Bioactivos

Las actinobacterias son productores prolíficos de metabolitos secundarios. Los compuestos bioactivos o metabolitos secundarios son productos metabólicos que no son esenciales para el crecimiento vegetativo de los organismos productores, pero se los considera compuestos de diferenciación que confieren roles adaptativos, por ejemplo, al funcionar como compuestos de defensa o como moléculas signantes en interacciones ecológicas. Se producen al final de la fase

de crecimiento exponencial y sus síntesis dependen en gran medida de las condiciones de crecimiento. La producción generalmente ocurre cuando el crecimiento está limitado por el agotamiento de un nutriente clave como el carbono o el nitrógeno.

Estos metabolitos secundarios son estructuralmente diversos y la mayoría de ellos están dotados de actividades biológicas, como agentes antimicrobianos, toxinas, pesticidas, ionóforos, biorreguladores y señalización de quórum. Los metabolitos bioactivos son profundamente utilizados como agentes antimicrobianos para el tratamiento de diversas dolencias (Adegboye and Babalola, 2013).

Actualmente la demanda de nuevos medicamentos es extremadamente urgente y extensa debido a dolencias comunes y la rápida propagación de enfermedades, el desarrollo de nuevas enfermedades con causas desconocidas y la propagación de patógenos resistentes a los antibióticos (Azman *et al.*, 2015). Los estudios de bioactividad de los metabolitos naturales de las actinobacterias raras se han vuelto populares. Los compuestos descubiertos a partir de estas actinobacterias tienen una estructura única y conducen directamente al desarrollo de nuevos antibióticos que son eficaces contra los patógenos resistentes a los antibióticos (Lam, 2006) (Ver Tabla 2-2).

Tabla 2-2 Ejemplos de compuestos bioactivos aislados de actinobacterias raras (Azman *et al.*, 2015).

Nombre Compuesto	Tipo y lugar de Muestra	Cepa	Actividad Biológica	Fuente
Pseudonocardians	Sedimento Marino, Sur de China	<i>Pseudonocardia sp.</i> SCSIO 01299	Antibacteriano y citotóxico	Li et al., 2011
Caerulomycins	Sedimento Marino Costa de Weihai, China	<i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i> WH1- 2216-6	Antibacteriano y citotóxico	Fu et al., 2011
Marinacarboline	Sedimento Marino, Sur de China	<i>Marinactinospora thermotolerans</i> SCSIO 00652	Antimalarial	Huang et al., 2011
Salinosporamides	Muestra Marina, Islas Bahamas	<i>Salinispora tropica</i> (strain CNB-392)	Citotóxico	Feling et al., 2003; Williams et al., 2005

Abyssomicins	Sedimento Marino, Japón	<i>Verrucosispora sp.</i> AB-18-032	Antibacteriano	Bister et al., 2004; Riedlinger et al., 2004
Marinomycins	Sedimento Marino, La Jolla, USA	<i>Marinispora</i> CNQ-140	Citotóxico	Kwon et al., 2006
Levantilides	Sedimento Marino, Mar Mediterráneo	<i>Micromonospora</i> M71-A77	Citotóxico	Gärtner et al., 2011

Un ejemplo exitoso proviene del género marino obligado *Salinispora*, del cual varias especies han sido aisladas de sedimentos marinos de Guam, Palau y el Mar Rojo (Mincer, Fenical and Jensen, 2005). Tiene la capacidad de producir salinosporamida A, un compuesto que inhibe el proteasoma 20S, convirtiéndose en un género con fuerte actividad antitumoral (Jensen *et al.*, 2015; Wohlleben *et al.*, 2016).

2.3.3.2 Potencial de Biodegradación de Metales Pesados

El potencial biotecnológico de las actinobacterias en el medio ambiente tiene que ver con su capacidad de eliminar contaminantes orgánicos e inorgánicos. Esta capacidad es la razón por la cual las actinobacterias han recibido especial atención como candidatas para la biorremediación, proceso que ha ganado importancia debido a la liberación generalizada de contaminantes al medio ambiente (Alvarez *et al.*, 2017).

Los metales pesados están presentes en el agua, el suelo, los sedimentos, el aire y los organismos vivos, y tienen un origen tanto natural como antropogénica. Las fuentes antropogénicas generan una contaminación creciente, constante y permanente, mientras que la fuente natural suele ser un fenómeno estacional, influenciado por el clima y generalmente no genera contaminación (Wuana and Okieimen, 2011). Los metales pesados son los principales contaminantes en el mar, en la tierra, en los vertidos industriales e incluso en las aguas residuales tratadas, en particular, en los países en desarrollo. Estos microcontaminantes inorgánicos se pueden acumular en el cuerpo humano a través de la cadena alimentaria, promoviendo así el desorden crónico y agudo y la generación de serios problemas de salud en la sociedad humana (El Baz, 2017).

La resistencia a metales puede estar muy extendida entre las actinobacterias vivas en ambientes contaminado (Amoroso *et al.*, 1998). Se ha reportado que los géneros *Streptomyces* y *Amycolatopsis* pueden sobrevivir en ambientes contaminados por metales pesados. Esto es probablemente debido a su notable resistencia a condiciones ambientales extremas y diversos contaminantes (El Baz, 2017).

2.4 Resistencia Antimicrobiana

La era moderna de los antibióticos comenzó con el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928. Desde entonces se desarrollaron nuevas clases de agentes antimicrobianos uno tras otro (Saga and Yamaguchi, 2009) los que han transformado la medicina moderna y han salvado millones de vidas (Ventola, 2015) .

Actualmente, los antibióticos disponibles en el mercado se producen por fermentación microbiana o se derivan a través de una ruta semisintética utilizando la estructura de un antibiótico ya existente. El descubrimiento de varios de estos antibióticos, acompañados con una nueva generación de fármacos semisintéticos condujo a pensar que cualquier enfermedad infecciosa podría controlarse con éxito utilizando antibióticos. Sin embargo, la aparición y propagación de cepas bacterianas resistentes a casi todos los antibióticos útiles durante las últimas décadas, reveló la limitación éstos (Sengupta *et al.*, 2013). Desde el momento en que se descubrieron los antibióticos, se han utilizado en exceso y con poca atención a la consecuencia inevitable de la resistencia (Carlet *et al.*, 2011).

Las bacterias poseen un número notable de mecanismos genéticos para la resistencia a los compuestos antibacterianos y existe un conjunto sustancial de genes de resistencia a los antibióticos en la naturaleza que ha evolucionado a lo largo de millones de años. La evolución y la propagación de organismos resistentes a múltiples fármacos se han acelerado dramáticamente en los últimos 50 años. A finales de la década de 1950 y principios de la de 1960, se detectó por primera vez resistencia en las bacterias entéricas: *Escherichia coli*, *Shigella* y *Salmonella*, (Levy and Marshall, 2004). Este período de tiempo coincide con el descubrimiento y el uso cada vez más generalizado de agentes antibacterianos (Friedman *et al.*, 2016).

Producto de esta resistencia antimicrobiana se atribuyen alrededor de 700.000 muertes anuales y se estima que para el año 2050 esta cifra podría llegar a los 10 millones (Ver Figura 2-4) (O'Neill, 2016). La consecuencia no es solo es un problema de salud, sino también un gasto económico global importante. Aumenta los costos de atención de salud, la duración de la estancia en los hospitales, la morbilidad y la mortalidad, tanto en los países desarrollados y en desarrollo (Founou *et al.*, 2017).

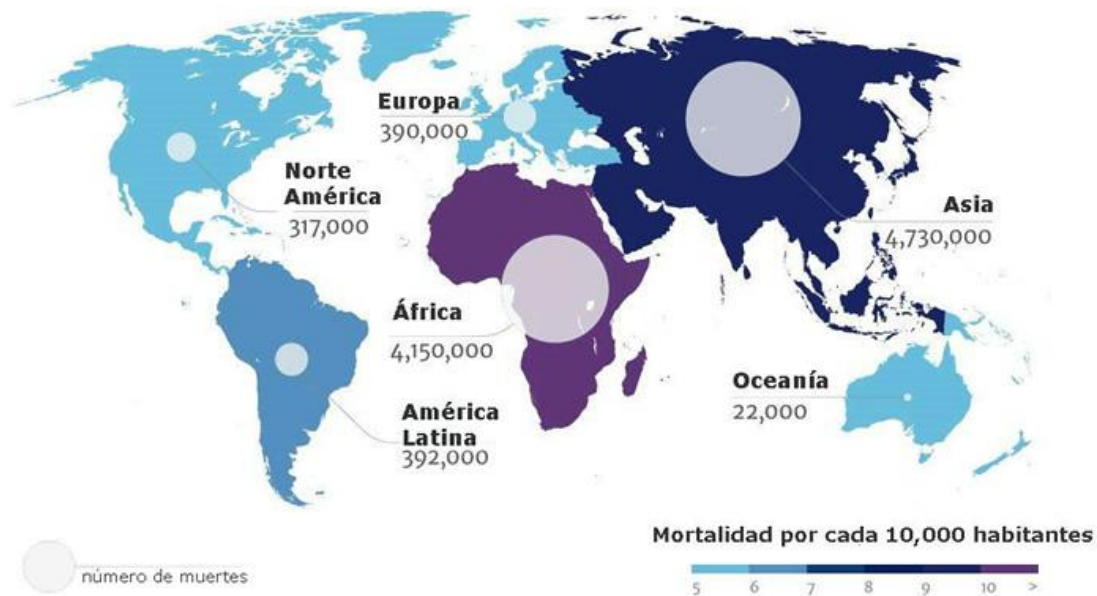


Figura 2-4 Estimación de cantidad de muertes atribuibles a la resistencia antimicrobiana para 2050. (World Health Organization, 2014)

El año 2016 las Naciones Unidas declararon la resistencia antimicrobiana como una de las mayores amenazas para la salud mundial (Hrvatín, 2017). Por lo mencionado anteriormente, se han desarrollado estrategias globales para combatir la resistencia. Una de ellas por ejemplo, es la educación pública y profesional sobre el uso racional de los antibióticos (Uchil *et al.*, 2014). Otra medida nace de la urgente necesidad de suplir los antibióticos que han perdido su eficiencia buscando nuevos compuestos bioactivos que tengan un efecto antimicrobiano (World Health Organization, 2014).

Algunas bacterias patógenas de importancia clínica con necesidad de encontrar nuevos agentes bioactivos son:

- *Staphylococcus aureus* es una bacteria Gram positiva del *Phylum Firmicutes*. En los humanos se encuentra frecuentemente en las fosas nasales, siendo portadora el 30% de la población aproximadamente (Tong *et al.*, 2015). Puede causar una variedad de infecciones que varían desde inflamaciones leves de la piel hasta enfermedades potencialmente mortales como neumonía, osteomielitis, sepsis, endocarditis y bacteriemia (Medina and Pieper, 2016). *S. aureus* presenta una preocupación importante a nivel mundial, tanto por su universalidad como por su capacidad de continuar desarrollando resistencia a los nuevos antimicrobianos (Bishop and Howden, 2007).
- *Listeria monocytogenes* es una bacteria Gram positiva de rápido crecimiento, con un nicho ecológico y un rango de hospederos inusualmente amplio. La infección en humanos y animales se considera por parte de alimentos contaminados. Esto debido a la propiedad del microorganismo de proliferar a temperaturas de enfriamiento, siendo el queso y la leche no pasteurizada las fuentes más comunes (Koufakis *et al.*, 2015). Puede conducir a enfermedades graves, a menudo fatales siendo la enfermedad más común entre las mujeres embarazadas, los recién nacidos y las personas inmunocomprometidas (Portnoy *et al.*, 2002).
- *Escherichia Coli* es una bacteria Gram negativa que típicamente coloniza el tracto gastrointestinal de los humanos a las pocas horas después del nacimiento (Kaper, Nataro and Mobley, 2004). Es el patógeno más común en las personas, causa la gran mayoría de las infecciones del tracto urinario (ITU), es la principal causa de bacteriemia en adultos y es la segunda causa más común de meningitis neonatal. El aumento de la resistencia a múltiples fármacos entre las cepas extraintestinal de *E. coli* constituye un obstáculo importante para el tratamiento y está comprometido en un número creciente de hospitalizaciones y muertes y en el aumento de los costos de atención médica asociados con las infecciones causadas por esta bacteria (Poolman and Wacker, 2016).
- *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria Gram negativa conocida por ser un patógeno oportunista. Puede causar infecciones potencialmente mortales en pacientes con defectos del sistema inmunológico, incluidos los pacientes con quemaduras. *P. aeruginosa* es una de las principales causas de infecciones adquiridas en el hospital, en particular para los pacientes ingresados en la UCI. La mayoría de estas infecciones a menudo son graves,

ponen en peligro la vida y no se pueden tratar debido a la alta resistencia a los agentes antimicrobianos y la falta de desarrollo de nuevos medicamentos (Lila *et al.*, 2017).

- *Salmonella enterica* es una bacteria Gram negativa anaerobia facultativa y un patógeno médicamente importante tanto para humanos como para animales (Andino and Hanning, 2015). La gastroenteritis es la manifestación más común de la infección por *S. enterica* en todo el mundo, seguida de bacteriemia y fiebre entérica. La composición genética de las cepas permite su adaptación en diversos entornos, incluidos los huéspedes humanos, animales y no animales. Esto aumenta la dificultad para combatirlas (Eng *et al.*, 2015).
- *Micrococcus luteus* es una bacteria en forma de coco Gram positivo estrictamente aerobia que habita principalmente en la piel, pero también en las mucosas, el agua y el suelo. Este organismo es reconocido como un patógeno oportunista y ha sido implicado en bacteremia, shock séptico y otras infecciones en pacientes inmunodeprimidos (Yang *et al.*, 2001). *M. luteus* puede adherirse a dispositivos médicos y causar infecciones en el torrente sanguíneo que generalmente ocurren después de la implantación a largo plazo de catéteres (Kogure *et al.*, 2014).

2.5 Agricultura

El tomate es el cultivo de hortalizas más grande del mundo con una producción anual de 169 millones de toneladas, que representa el 16% de la producción total de vegetales y 58 mil millones de dólares (Nandi *et al.*, 2018). A nivel nacional, Chile no se caracteriza por tener un mercado exterior del tomate. Sin embargo, y desde el punto de vista de la alimentación, el tomate también es considerado la hortaliza más importante. Ocupa el primer lugar dentro de las hortalizas de la canasta, lo que significa que es a la que los hogares destinan más recursos (Flaño Ipinza, 2013).

El Cancro bacteriano del tomate, causado por *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (Cmm), se considera una grave amenaza para el procesamiento y las industrias de tomate de mercado fresco, habiendo causado epidemias catastróficas en la mayoría de las áreas de cultivo de tomate en el mundo (Nandi *et al.*, 2018). Es un patógeno transmitido por la semilla y se considera una de las enfermedades bacterianas más destructivas de este cultivo (Figura 2-5).



Figura 2-5 Ejemplos de infección por *cmm* en tomate. (Palacio Bielsa, 2010)

Fue reportado por primera vez por E. F. Smith a principios del siglo XX en Michigan, Estados Unidos, y actualmente está presente en todo el mundo. Su movimiento a largas distancias se ve facilitado por las semillas comercializadas, lo que explica su distribución en todas las regiones productoras de tomate del mundo. Además puede sobrevivir en restos de plantas y en plantas voluntarias o huéspedes alternativos que pueden actuar como fuentes locales de inóculo (de León *et al.*, 2011).

Cmm es un actinomiceto Gram positivo que sobrevive en el suelo, en estacas, en espalderas, bancos de invernadero y herramientas durante meses o años debido a su capacidad para tolerar la desecación y las temperaturas frías. Las pequeñas poblaciones bacterianas pueden aumentar rápidamente durante la producción de trasplante comercial por salpicaduras de agua y/o equipo. Además, los brotes suelen pasar desapercibidos durante largos períodos de tiempo, ya que las infecciones latentes y las plántulas asintomáticas son relativamente frecuentes. Actualmente existen pocos controles químicos efectivos (Tancos *et al.*, 2013).

2.6 Contaminación por Metales Pesados en Océanos

Los metales pesados son componentes naturales del ambiente marino y de agua dulce, que generalmente se encuentran en concentraciones muy bajas. Estos se clasifican como contaminantes cuando se agregan en cantidades suficientes para producir efectos nocivos (Nammalwar, 1983).

La actividad humana ha aumentado inevitablemente los niveles de iones metálicos en muchos de sistemas de agua naturales. El drenaje de minas, exploración de petróleo y gas en alta mar, los residuos industriales (pesticidas, pinturas, cuero, textiles, fertilizantes, productos farmacéuticos) y efluentes domésticos, escorrentía agrícola, lluvia ácida, etc., han contribuido a que la mayor carga de metal en estas aguas se incorpore finalmente a los sedimentos marinos (Ansari *et al.*, 2004); desde donde pueden ser bioacumulados por organismos marinos e incluso biomagnificados a través de la cadena alimentaria, lo que resulta en niveles elevados en organismos depredadores (Rainbow and Luoma, 2011).

Aunque algunos metales pesados son esenciales para la vida y algunos son meramente beneficiosos, muchos de ellos son altamente tóxicos. Las concentraciones a las cuales los metales pueden considerarse importantes varían ya que algunos son esenciales en niveles bajos pero tóxicos en otras. Los criterios para establecer si un rastro de metal pesado es esencial para el crecimiento saludable normal de plantas y/o animales incluyen si el organismo no puede crecer ni completar su ciclo de vida sin un suministro adecuado del elemento; si el elemento no puede ser completamente reemplazado por ningún otro elemento, si el elemento tiene una influencia directa sobre el organismo y está implicado en su metabolismo (Ansari *et al.*, 2004). Algunos metales (como Cu y Zn) son cofactores fundamentales en una serie de procesos bioquímicos, mientras que otros (como Cd, Hg y Pb) no tienen funciones biológicas conocidas en animales; sin embargo, todos los metales son tóxicos a concentraciones elevadas (Ivanina and Sokolova, 2015).

Desde la década de 1950 y con la ocurrencia de la enfermedad de *Itai-itai* causada por cadmio y la enfermedad de *Minamata* causada por mercurio en Japón, la contaminación por metales pesados, especialmente en ambientes marinos, ha sido motivo de gran preocupación debido a su toxicidad inherente, fuentes extensas, persistencia, y no degradabilidad (Wang *et al.*, 2013).

Algunos de los metales más significativos son:

- *Mercurio* (Hg) es un metal traza bioacumulativo y tóxico cuyas emisiones al medio ambiente han aumentado significativamente como resultado de actividades antropogénicas como la minería y la combustión de combustibles fósiles (Ver **Figura 2-6**). Varios modelos recientes han estimado que estas emisiones han aumentado el inventario de mercurio oceánico de 36 a 1313 millones de moles desde el año 1500 (Lamborg *et al.*, 2014).

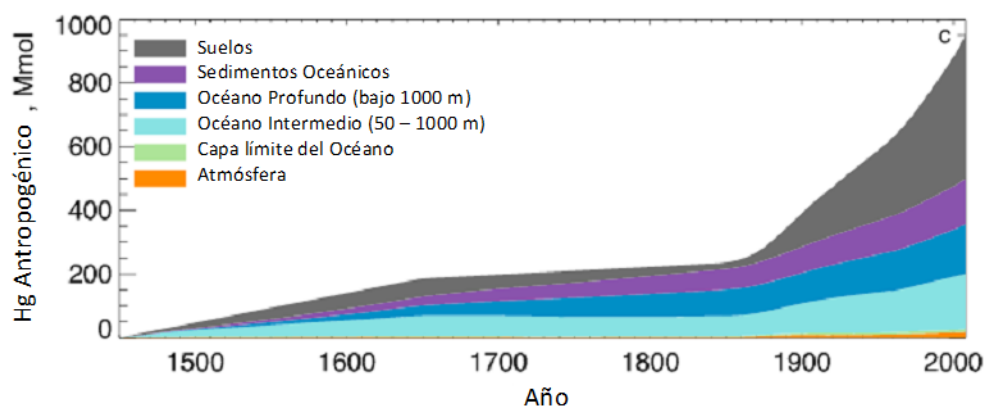


Figura 2-6 Estimación de la concentración de Mercurio en el Océano a partir de datos reportados en la literatura de 120 perfiles de sedimentos de lagos y 88 datos de concentración de Hg. (Zhang *et al.*, 2014)

Una vez en la atmósfera, el Hg se transporta globalmente hasta que se deposita en la superficie de la Tierra, donde se bioacumula en las cadenas alimentarias acuáticas como metilmercurio altamente tóxico (Zhang *et al.*, 2014). Se difunde en fitoplancton y luego pasa a la cadena alimenticia en cantidades que se acumulan constantemente. Los grandes peces predadores como el atún, por ejemplo, contienen aproximadamente 10 millones de veces más metilmercurio que el agua que los rodea (Winner, 2010). La concentración de mercurio total en la mayoría de los alimentos que no son pescados y mariscos es muy baja, menor a $< 0,01[\mu\text{g/g}]$, y la mayor parte del mercurio existe en forma de mercurio inorgánico. Sin embargo, los pescados y mariscos, contienen cantidades mucho mayores de mercurio y el 90% del mercurio existe en forma de metilmercurio (Hong *et al.*, 2012).

Las dosis altas de mercurio pueden ser fatales para los humanos, pero incluso dosis relativamente bajas de compuestos que contienen mercurio pueden tener un impacto adverso grave sobre el sistema nervioso en desarrollo, y recientemente se han relacionado con posibles efectos dañinos en los sistemas cardiovascular, inmune y reproductivo. El mercurio y sus compuestos afectan el sistema nervioso central, los riñones y el hígado y pueden alterar los procesos inmunes; causa temblores, problemas de visión y audición, parálisis, insomnio e inestabilidad emocional. Durante el embarazo, los compuestos de mercurio atraviesan la barrera placentaria y pueden interferir con el desarrollo del feto y causar retrasos en el desarrollo y la atención durante la infancia.

- *Cobre (Cu)* es un nutriente traza esencial que se requiere en pequeñas cantidades, 5-20 [µg/g], por humanos, otros mamíferos, peces y mariscos para el metabolismo de los carbohidratos y el funcionamiento de más de 30 enzimas. El cobre es moderadamente soluble en agua y se adhiere fácilmente a los sedimentos y la materia orgánica. La bioconcentración es particularmente alta en los animales que se encuentran en los sedimentos en el fondo de un cuerpo de agua y en mariscos, como las ostras, que puede filtrar materiales de grandes volúmenes de agua.

La forma de cobre más biodisponible y, por lo tanto, la más tóxica es el ion cúprico (Cu^{+2}). Los peces y los crustáceos son de 10 a 100 veces más sensibles a los efectos tóxicos del cobre que los mamíferos. Las algas, especialmente las especies de algas azul-verdosas, son 1,000 veces más sensibles a los efectos tóxicos del cobre que los mamíferos (Solomon, 2009).

- *Cromo (Cr)* es un elemento considerado por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) como uno de los 129 contaminantes prioritarios y uno de los 14 metales pesados más nocivos. Varios organismos han demostrado que la exposición a Cr (VI) por vía de inhalación es cancerígeno. Las propiedades anticorrosivas y curtientes únicas del cromo favorecen su utilización generalizada en las industrias de cromado, curtiembres, etc. Sin embargo, no muchas industrias siguen las normas de tratamiento de desechos tóxicos antes de su liberación al medio ambiente. Esto ha resultado en una mayor carga tóxica ecológica que conduce a la contaminación del agua subterránea (Sharma *et al.*, 2012).
- *Cobalto (Co)* es un oligoelemento esencial ampliamente distribuido en la naturaleza. La mayor parte del cobalto consumido se utiliza en la fabricación de aleaciones, y aunque no se libera extensamente en el medio ambiente, puede representar un peligro para la salud humana. Además, el exceso de cobalto en la dieta produce efectos tóxicos en los animales (Domingo, 1989).
- *Níquel (Ni)* es un metal que en el medio ambiente se encuentra principalmente combinado con oxígeno o azufre en forma de óxidos y sulfuros y puede formar complejos estables con la materia orgánica disuelta. Tanto al óxido como al sulfuro de níquel, se han asociado con cáncer de pulmón. El níquel que se encuentra en aguas superficiales proveniente de la precipitación pluvial de partículas suspendidas en la atmosfera y por lixiviación. Las descargas de aguas residuales domésticas y de diversas

industrias (metalúrgicas, fábricas de baterías y pinturas) en los cuerpos de agua han incrementado su concentración en esos ecosistemas, disminuyendo su utilización como agua potable y para fines agrícolas e industriales (Duca *et al.*, 2012).

- *Arsénico* (As) es un elemento químico ambiental de gran preocupación para la salud humana. Presenta una amplia distribución en rocas, suelo, agua y aire. El compuesto de arsénico se clasifica en dos: arsénico inorgánico y arsénico orgánico. El arsénico inorgánico es generalmente abundante en aguas subterráneas utilizadas para beber en varios países del mundo, como Chile, mientras que los compuestos orgánicos de arsénico se encuentran principalmente en peces, lo que puede dar lugar a la exposición humana. El agua subterránea contaminada con arsénico es la principal fuente de exposición humana y animal al arsénico. La exposición crónica a este metal puede causar cánceres de piel, pulmón y vejiga (Mandal, 2017).

2.6.1 Contaminación por Metales Pesados en Chile

El desarrollo económico experimentado por Chile en los últimos años ha llevado a un mayor estrés en los sistemas acuáticos. El informe de la OCDE ha demostrado que a pesar del crecimiento económico se ha tenido que enfrentar un costo ambiental. La misma organización ha declarado que la calidad del aire y la disponibilidad de agua han disminuido, debido a la gran dependencia de los recursos naturales y que se han implementado mecanismos insuficientes para internalizar las externalidades ambientales y la gestión ambiental (OECD Environmental Performance Reviews: Chile 2016).

En Chile, como consecuencia del desarrollo minero en el norte y el desarrollo industrial en la zona central, se registra una creciente y preocupante contaminación ambiental en los ecosistemas costeros por las altas concentraciones de metales que afecta desde el subsuelo hasta la atmósfera, incluyendo suelos y cuerpos de agua (Espejo *et al.*, 2017). En las regiones costeras industrializadas, las actividades antropogénicas son las principales fuentes de contaminación en el medio marino. Debido a esto, la composición de los sedimentos marinos ha sido alterada, ya que estos se han convertido en un depósito de una variedad de contaminantes emitidos desde la atmósfera o el suelo en la columna de agua (Parra *et al.*, 2015).

Uno de los lugares más cuestionados del país es la Bahía de Quintero. Este representa un lugar de gran importancia económica, ya que en su límite costero se ubica un complejo industrial de importantes dimensiones (principalmente una fundición de cobre y una termoeléctrica). Las actividades en este complejo industrial han demostrado ser potenciales de descarga de trazas de metales al ecosistema marino. El año 2014, y producto de constantes presiones, se realizó un plan de vigilancia a los productos de mar de la zona para comprobar el efecto de los metales. El resultado fueron altos índices de presencia de arsénico y cadmio tanto en mariscos como pescados (Ver Figura 2-7).

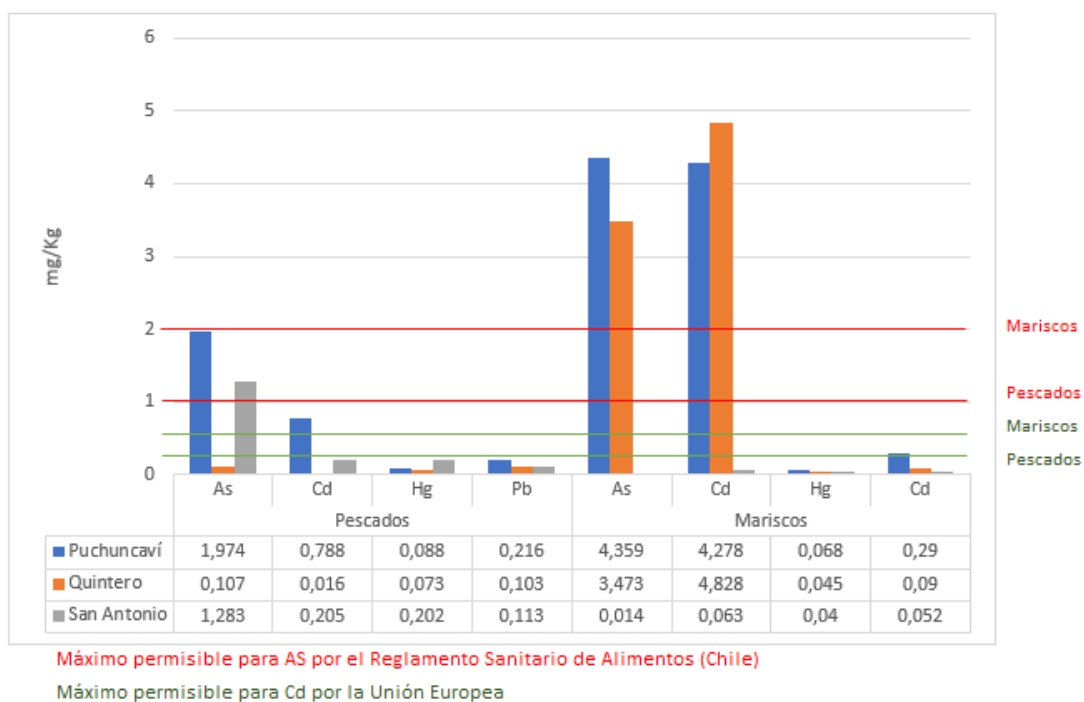


Figura 2-7 Concentración promedio de metales en muestras de productos de mar tomadas por comuna [mg/kg]. (Ministerio de Medio Ambiente de Chile, 2014)

En los últimos 10 años, la zona ha experimentado 8 episodios de intoxicación. Siendo icónico el caso de la Escuela La Greda el año 2011, donde 31 menores de edad y 7 adultos resultaron afectados por emanaciones de SO_2 que llegaron a un máximo de $900 \text{ [ug/m}^3\text{]}$, cuando según las indicaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), lo recomendable es de $500 \text{ [ug/m}^3\text{]}$ como máximo.

3 Procedimiento Experimental

3.1 Selección de Cepas y Medios de Cultivo

3.1.1 Selección de Cepas

Para la selección de cepas, se procedió a realizar un estudio del cepario perteneciente al grupo de trabajo del laboratorio. Los parámetros utilizados se abordan en los puntos 3.1.1.1 y 3.1.1.2.

3.1.1.1 Actinobacterias no Streptomyces

Como se menciona en el punto 2.3, las actinobacterias, y en particular el género *Streptomyces*, han contribuido con aproximadamente la mitad de los compuestos bioactivos caracterizados hasta la fecha. Sin embargo, las posibilidades de descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas de *Streptomyces* han disminuido, y es muy frecuentes encontrar los mismos compuestos una y otra vez. Por lo tanto, se ha vuelto relevante el aislamiento, selección y cultivo de actinobacterias raras de localizaciones ambientales raras como fuentes marinas (Azman *et al.*, 2015).

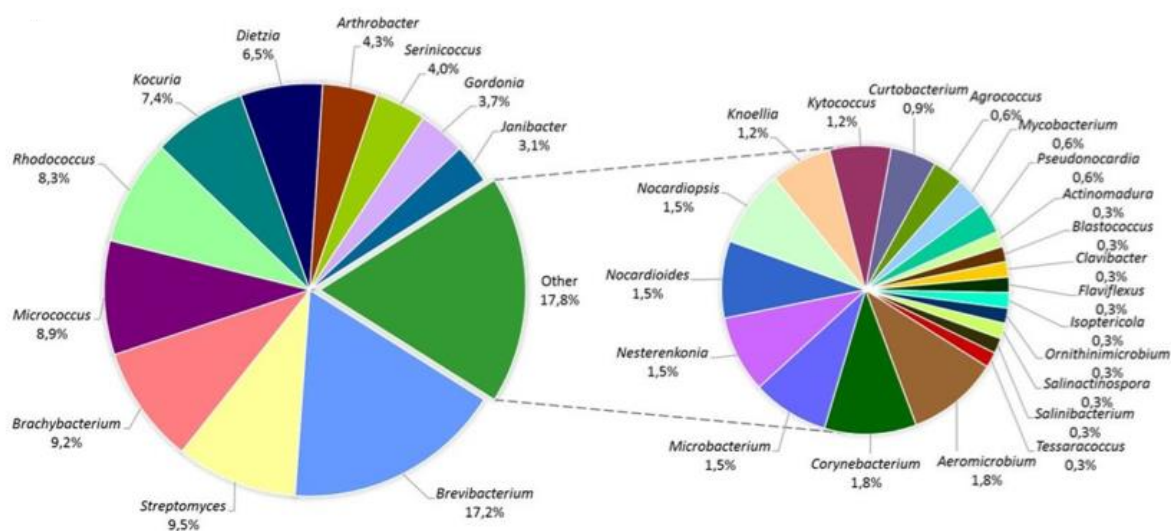


Figura 3-1 Diversidad de Actinobacterias presentes en el Laboratorio. (Cumsille *et al.*, 2017)

El laboratorio cuenta con un cepario de 325 actinobacterias, pertenecientes a 32 géneros distintos (Ver Figura 3-1), resultado de seis expediciones de muestreo a través de distintas regiones costeras de Chile. Sedimentos y esponjas marinas fueron recolectados por buceadores de la III Región, específicamente en los alrededores de la isla Chañaral de Aceituno. De la V Región, se tomaron muestras de dos localidades diferentes: la bahía de Valparaíso, donde se recolectaron sedimentos marinos, provenientes de playa y uno de agua de mar, y de Rapa Nui, donde se obtuvieron sedimentos y esponjas marinas. En la X región se recolectaron sedimentos en el Fiordo de Comau y se sumó a la colección un erizo de mar obtenido en la isla de Chiloé. Finalmente, de la XI región se obtuvieron sedimentos marino del Golfo de Penas (Ver Figura 3-1) (Cumsille *et al.*, 2017).

Dentro del cepario destacan los géneros *Brevibacterium* y *Streptomyces*, siendo los de mayor predominancia con un total de 56 y 31 cepas respectivamente. Además, se tienen 9 cepas de géneros únicos: *Actinomadura*, *Blastococcus*, *Clavibacter*, *Flaviflexus*, *Isoptericola*, *Ornithinimicrobium*, *Salinactinospora*, *Salinibacterium*, y *Tessaracoccus*.

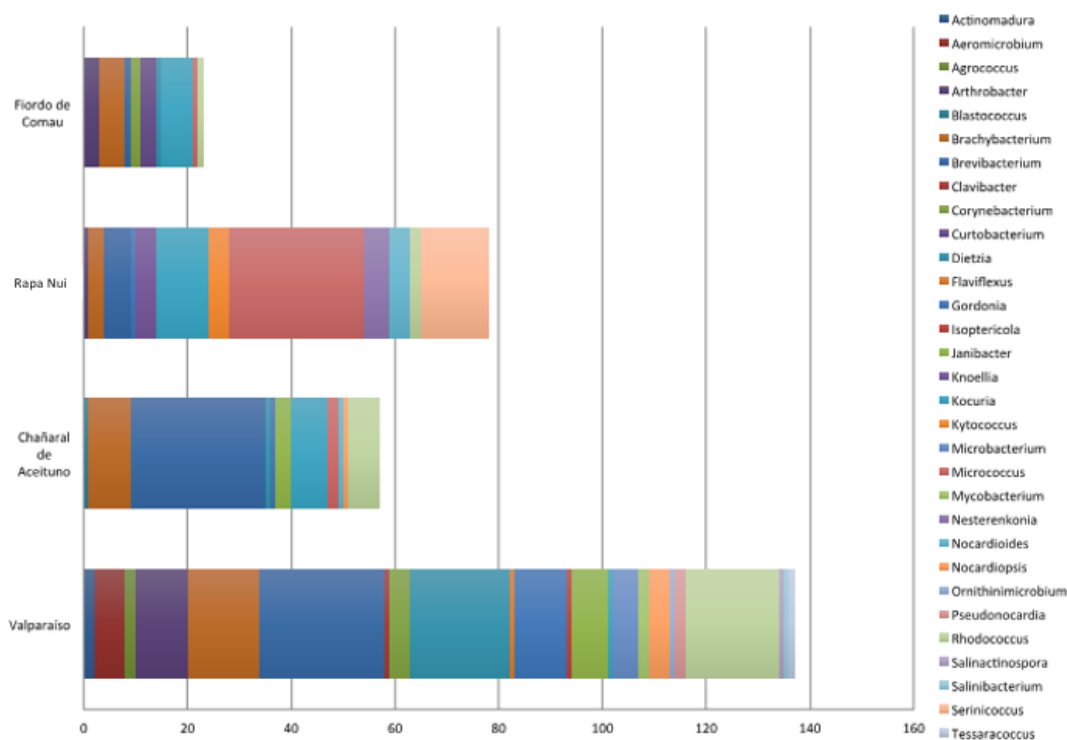


Figura 3-2 Diversidad de Actinobacterias según lugar de muestreo: Fiordo de Comau, Rapa Nui, Chañaral de Aceituno y Valparaíso.

De las 325 actinobacterias, 69 pertenecen a Chañaral de Aceituno, 148 a Valparaíso, 82 a Rapa Nui, 25 a Fiordo de Comau y 1 a Golfo de Penas. 294 son actinobacterias raras, destacándose la V región con una gran diversidad (Ver Figura 3-2).

3.1.1.2 Cepas no *Streptomyces* con actividad antimicrobiana

Anteriormente se han realizado en el laboratorio antibiogramas y ensayos de extractos crudos de algunas de estas actinobacterias contra: *Staphylococcus aureus* (STAU), *Listeria monocytogenes* (LIMO), *Escherichia coli* (ESCO), *Pseudomonas aeruginosa* (PSAU) y *Salmonella enterica* (SAEN). La primera prueba se realiza utilizando el método *Cross streak* (Haber and Ilan, 2014) y permite observar los posibles comportamientos que puede presentar la cepa frente a las cepas modelos. Los ensayos de extractos crudos y su método se describen en el punto 3.2.2.

Los resultados previos disponibles corresponden a antibiogramas pertenecientes a 44 cepas de Valparaíso, 8 de Chañaral de Aceituno, 44 de Rapa Nui y 23 del Fiordo de Comau. Además, se dispone de resultados de 4 cepas de cada uno de los dos últimos lugares nombrados, por el método extractos crudos.

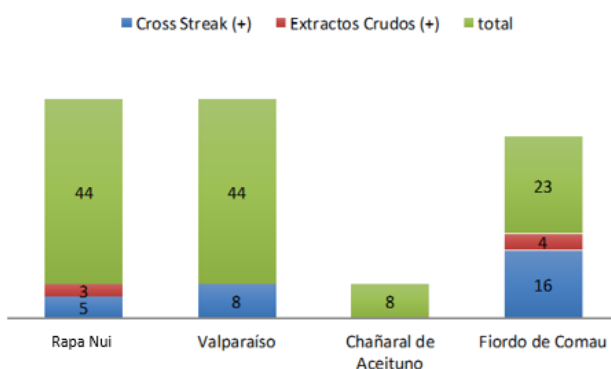


Figura 3-3 Resultados positivos obtenidos por métodos de *Cross streak* y Extractos crudos.

A partir de los resultados de la Figura 3-1 más la información previa existente, se realizó una selección considerando distintos géneros, lugares de procedencia y actividades descritas, quedando con un grupo de 9 actinobacterias no *Streptomyces* (Ver Tabla 3-1).

Tabla 3-1 Resultados previos de cepas escogidas.

Cepa	Género	Lugar de Procedencia	Método	Solvente	Medio	STAU	PSAU	SAEN	ESCO	LIMO
H-KB5	<i>Kocuria</i> sp.	Fiordo de Comau	Extractos crudos	Hexano	ISP2 / ASW	-	-	-	-	nd
				Acetato de etilo		+	+	+	+	nd
				Metanol		-	-	-	-	nd
H-JH3	<i>Arthrobacter</i> sp.	Fiordo de Comau	Extractos crudos	Hexano	ISP2 / ASW	-	-	-	-	nd
				Acetato de etilo		-	-	-	-	nd
				Metanol		-	-	+	+	nd
IpEH-1	<i>Brachybacterium</i> sp.	Isla de Pascua	Extractos crudos	Acetato de etilo	ISP2 / ASW	++	-	-	-	+
H-BE7	<i>Brevibacterium</i> sp.	Fiordo de Comau	Extractos crudos	Hexano	ISP2 / ASW	-	-	-	-	nd
				Acetato de etilo		-	-	+	-	nd
				Metanol		-	-	-	-	nd
Vc820	<i>Brevibacterium</i> sp.	Valparaíso	<i>Cross streak</i>	-	TSA	+	-	+/-	+/-	+/-
					ISP2	+++	-	+/-	-	+++
VO30-3	<i>Arthrobacter</i> sp.	Valparaíso	<i>Cross streak</i>	-	TSA	+	-	+/-	+++	+++
					ISP2	-	-	-	-	-
VP2-3	<i>Microbacterium</i> sp.	Valparaíso	<i>Cross streak</i>	-	ISP2	+/-	nd	nd	-	+++
					TSA	+/-	-	-	-	+/-
VO40-3	<i>Aeromicrobium</i> sp.	Valparaíso	<i>Cross streak</i>	-	ISP2	++	-	-	-	++
					TSA	++	+/-	+/-	+/-	++
H-ED12	<i>Curtobacterium</i> sp.	Fiordo de Comau	<i>Cross streak</i>	-	ISP2	++	-	+/-	+/-	+
					TSA	++	-	-	+/-	++

Donde: - No existe inhibición en el crecimiento de las cepas modelo. +/- Atenuación de crecimiento. + Crecimiento menor. ++Crecimiento medio. +++ Inhibición en el crecimiento de la cepa modelo. Nd no determinado.

3.1.2 Medios de Cultivo

La fermentación es un procedimiento extremadamente importante para el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos. Cada cepa de actinobacteria necesita diferentes condiciones de fermentación; incluidos los componentes, la concentración, el pH del medio, el tiempo, la temperatura y la aireación. El objetivo de este proceso es producir la mayor cantidad de potenciales sustancias bioactivas (Jiang *et al.*, 2016). La fuente de carbono juega un papel importante como fuente de precursores y energías para la producción de metabolitos secundarios. Estos metabolitos secundarios no dependen totalmente del crecimiento de microorganismos, sino también, de las condiciones adversas impuestas por el medio o el entorno. Es por esto que el diseño de un medio de producción apropiado es un paso importante en la producción de metabolitos secundarios (Naik *et al.*, 2015).

Se escogieron dos medios clásicos para actinobacterias: **ISP-1/ASW** y **ISP-2/ASW**, y tres medios novedosos: **SM19**, **R5A** y **SG - modificado**. (Ver Anexo A). Los primeros dos debido a sus componentes ricos en carbono y nitrógeno. Ambos estudiados y demostrados que ayudan a maximizar la producción de metabolitos (Usha Kiranmayi *et al.*, 2011). Los medios SM19 y R5A poseen ingredientes diferentes, como salsa de tomate y casaminoácidos respectivamente, que podrían inducir nuevos y distintos metabolitos (Becerril *et al.*, 2018). El último medio que fue utilizado, SG, posee originalmente entre sus componentes glucosa. Elemento que se sustrajo de forma de imponer una condición restrictiva, ya que su ausencia puede causar producción tardía o inhibición de producción (Escher *et al.*, 2016).

3.2 Producción de Compuestos Bioactivos

El procedimiento utilizado se basa en el llevado a cabo por A. Undabarrena (Undabarrena *et al.*, 2016) adaptando el solvente de resuspensión para obtener mejores resultados.

3.2.1 Fermentación de Actinobacterias

A partir de colonias frescas, se realizaron pre-inóculos en tubos Falcon con 30 [mL] de caldo LB (Ver Anexo A), y se incubaron en un agitador orbital a 30°C por 2 días. Luego, en un espectrofotómetro se midió la densidad óptica (OD) del pre-inóculo a 600 [nm] y se hicieron cultivos líquidos en matraces de 250 [mL] con 50 [mL] de caldo de cultivo. Los cultivos se inocularon con el objetivo de lograr una OD₆₀₀ de 0,2. Se utilizaron 5 medios distintos, correspondientes a: ISP-1/ASW, ISP-2/ASW, R5A, SM19 y SG modificado (Ver Anexo A). Se incubaron en un agitador orbital a 30°C por un periodo de 10 días. Se realizaron ensayos en distintos cultivos líquidos de manera de ver si existe inhibición de crecimiento de la cepa modelo de interés.

3.2.2 Ensayos de Actividad Antibacteriana con Extractos Crudos

Para la obtención de extractos crudos, se utilizaron 50 [mL] de cultivo líquido. Primeramente, se lleva a centrifuga a 5.000 [rpm] por 10 minutos, para separar sobrenadante de pellet. El pellet es desechado y los sobrenadantes se trabajan para obtener extractos crudos.

Una vez que el cultivo es centrifugado, el sobrenadante es almacenado en un frasco de vidrio. Para evitar la interacción del solvente con material plástico, en adelante se trabaja sólo con material de vidrio. Luego, se lleva a un embudo decantador y se realiza la extracción con acetato de etilo en relación 1:1. El embudo decantador se agita vigorosamente de manera manual y se deja en reposo para que se separen las fases. La fase acuosa usualmente queda en la parte inferior. Esta se recupera en el mismo frasco del sobrenadante y la fase orgánica se aparta en otro frasco de vidrio. Se repite nuevamente el proceso con la fase acuosa, agitando el embudo decantador en concentración 1:1 con acetato de etilo. De esta manera se obtiene el doble de volumen de fase orgánica en comparación con el volumen de sobrenadante inicial.

La fase orgánica posee los posibles compuestos de interés, por lo que para eliminar parte del acetato de etilo se lleva en un balón a Rotavapor, evaporando el solvente a 45°C, hasta quedar con aproximadamente 5 a 10 [mL] de volumen en el balón, para evitar que el extracto se pegue a las paredes del Rotavapor. Luego, el volumen obtenido se pasa a tubos Eppendorf previamente

tarados, y se llevan a Speedvac a temperatura ambiente por aproximadamente 2 horas, dónde se termina de evaporar el solvente. Finalizado esto, se pesan nuevamente los tubos Eppendorf para saber la cantidad de extracto crudo obtenida.

Para el ensayo de actividad antibacteriana, los extractos secos de sobrenadante se resuspenden en metanol - agua (50%) a modo de obtener una concentración de 5 [mg/mL] de extracto. El extracto seco que no fue utilizado se guarda a -20°C.

En placas con medio LB previamente marcadas, se realiza un sembrado tipo césped de cada una de las cepas por separado, contra las cuales se desea ver la susceptibilidad de los extractos. Se utilizaron siete cepas modelo. Seis de éstas de interés clínico y una de interés agrícola, para probar su susceptibilidad contra extractos crudos producidos desde las actinobacterias escogidas. Las cepas modelo corresponden a *Staphylococcus aureus* (STAU), *Listeria monocytogenes* (LIMO), *Micrococcus luteus* (MILU), *Clavibacter michiganensis* (CLMI) todas Gram positivas, y *Escherichia coli* (ESCO), *Pseudomonas aeruginosa* (PSAU) y *Salmonella enterica* (SAEN), las tres Gram negativas. Para el ensayo, estas fueron inoculadas en 5 [mL] de caldo LB dispuestos en tubos de ensayos e incubados en un agitador orbital por 24 horas a 30°C para LIMO, MILU y CLMI y a 37°C para STAU, ESCO, PSAU y SAEN. La densidad óptica (OD) se midió a 600 [nm] y el inóculo se ajustó y guardó en un tubo Eppendorf a una concentración final de $OD_{600} = 0,2$. Para la siembra, se introduce una tórula estéril en el tubo Eppendorf, previamente preparado, y se hace un barrido hacia abajo y hacia arriba sin levantar la tórula. Esto se repite cuatro veces, en cuatro direcciones diferentes, para cubrir de manera homogénea toda la superficie de la placa.

Una vez secas las placas, se les agregan 10 [µL] de cada extracto en concentración de 5 [mg/mL] con Methanol-Agua al 50% en diferentes cuadrículas, cuidando que las gotas no se toquen entre sí. Además, se incluyen como control 10 [µL] de Methanol-Agua al 50%. Finalmente, las placas se incuban a 37°C por 24 horas para STAU, ESCO, PSAU y SAEN, y por 48 horas para LIMO, MILU y CLMI.

Para el análisis de los resultados, se compara el tamaño del diámetro de los halos de inhibición, según los criterios mencionados en la Tabla 3-2.

Tabla 3-2 Criterios para análisis de resultados.

Resultado	Observación
-	Sin inhibición
+/-	Atenuación del crecimiento de la cepa modelo en la zona de la gota
+	Presencia de halo de inhibición del tamaño de la gota
++	Presencia de halo de inhibición de mayor tamaño al de la gota

3.3 Búsqueda de Nuevos Productos

Cuatro extractos de interés se enviaron a Fundación MEDINA (Granada, España) para realizar una desreplicación química mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas de alta resolución (LC-HRMS).

Las muestras se analizaron utilizando un HPLC 1200 (Agilent) de resolución rápida acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución MaXiz (Bruker). Para la separación, se usó una columna SB-C8 Zorbax (2,1 x 30 [mm], 3,5 [μm]), usando un caudal de 0,3 [ml/min]. La fase móvil consistió en solvente A, H₂O:Acetonitrilo (AcN) (90:10); y solvente B, H₂O:AcN (90:10); ambos con formiato de amonio 13 mM y 0.01% de ácido trifluoroacético (TFA).

La combinación del tiempo de retención y de la masa exacta se utilizó como criterio de búsqueda en la base de datos de espectrometría de masas de alta resolución de Fundación MEDINA. En el supuesto de que se encuentre alguna coincidencia, este dato se reporta con el nombre del compuesto. Para aquellos componentes sin coincidencias en la base de datos mencionada, se realizó una búsqueda de la masa exacta o fórmula molecular en el Diccionario de Productos Naturales (DPN) de *Chapman & Hall*. Si se encuentra una posible coincidencia, considerando la masa exacta o fórmula molecular, el organismo productor y el espectro UV, la molécula se etiqueta como el componente sugerido.

En la Figura 3-4 se resume la metodología utilizada y descrita previamente para los ensayos de actividad antimicrobiana.

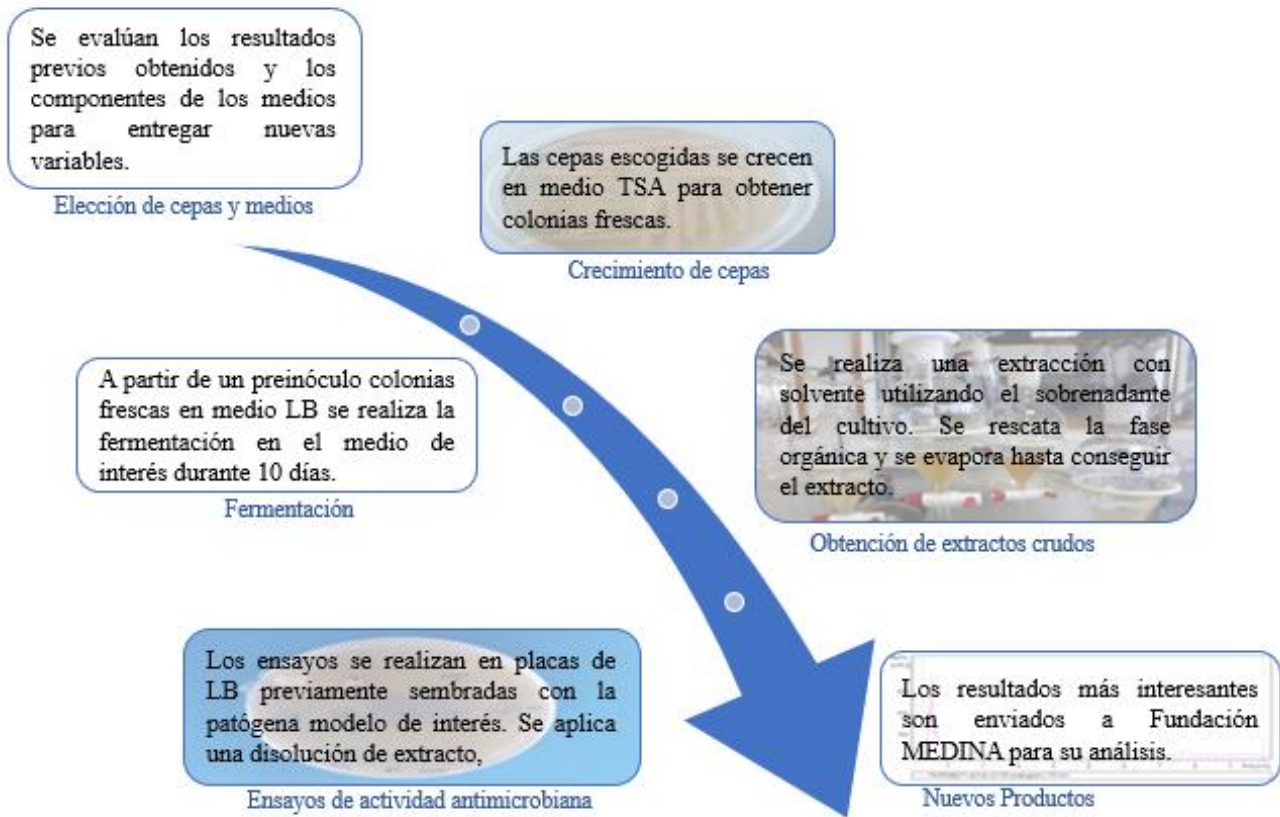


Figura 3-4 Resumen metodología

3.4 Estudio de biorremediación de metales pesados

En este ensayo, se probó la resistencia de las actinobacterias a algunos metales pesados. Para realizarlo se utilizó el procedimiento empleado por A. Undabarrena (Undabarrena *et al.*, 2017) con las concentraciones modificadas previamente descritas (El Baz *et al.*, 2015).

El ensayo se debe realizar utilizando un medio mínimo que entregue los recursos justos para el crecimiento de las bacterias. De esta manera, el resultado obtenido será consecuencia de los metales añadidos en el medio. Para esto, se escogió un medio probado anteriormente preparado con agua de mar artificial (ASW) debido a las características de las actinobacterias trabajadas.

Tabla 3-3 Sales de metales utilizadas para medir potencial de biodegradación.

Sales de Metal	Concentración inicial [mM]
HgCl₂	5
CuSO₄	500
CoCl₂	7,70
NiSO₄	2000
NaAsO₂	500
K₂CrO₄	2000

Previo al ensayo, se procede a marcar las placas de forma de utilizar en cada una tres actinobacterias diferentes. En total se utilizaron 36 placas.

Las sales de metales se diluyen en el MM/ASW (Ver Anexo A) en estado líquido, justo al momento de realizar las placas. Fueron empleadas 6 sales de metales: HgCl₂, CuSO₄, CoCl₂, NiSO₄, NaAsO₂ y K₂CrO₄ (Ver Tabla 3-3) para conseguir dos concentraciones finales: 0,02 [mg/mL] y 0,08 [mg/mL]. Posteriormente se siembran las placas y son incubadas a 30 °C para su evaluación a los días 7 y 14 .

Para el análisis de los resultados se consideran los criterios mencionados en la Tabla 3-4.

Tabla 3-4 Criterios de análisis de resultados.

Resultado	Observación
+	No existe inhibición en el crecimiento de las cepas
-	Inhibición en el crecimiento de la cepa

4 Resultados

4.1 Producción de Compuestos Bioactivos

4.1.1 Ensayos de Actividad Antibacteriana con Extractos Crudos

A las nueve actinobacterias seleccionadas se les realizó el procedimiento de obtención de extractos crudos a partir de sobrenadantes obtenidos en cada uno de los cultivos realizados. Estos extractos fueron resuspendidos en Metanol - Agua (50 %) y llevados a una concentración de 5 [mg/mL]. Se utilizaron 10 [μL] del extracto resuspendido para la realización de los ensayos de actividad antibacteriana, el que contempló evaluar la actividad contra las mismas 6 cepas modelo de interés clínico y 1 de interés agrícola: *Staphylococcus aureus* (STAU), *Listeria monocytogenes* (LIMO), *Micrococcus luteus* (MILU), *Escherichia coli* (ESCO), *Pseudomonas aeruginosa* (PSAU), *Salmonella enterica* (SAEN) y *Clavibacter michiganensis* (CLMI).

Cada cultivo de cada una de las 9 cepas de actinobacterias fue probado en un período de 10 días y 5 medios diferentes de cultivo. De esta manera fue posible observar si existe alguna diferencia o dependencia en la actividad antibacteriana según el medio de los cultivos.

Para poder analizar y comparar la actividad inhibitoria de la actinobacteria contra el crecimiento de la cepa modelo vista en el ensayo de actividad antibacteriana con extractos crudos, se cuantificaron los resultados según los criterios presentados en la Tabla 4-1.

Tabla 4-1 Criterios para análisis de resultados por extractos crudos.

Resultado	Observación
-	Sin inhibición
+/-	Atenuación del crecimiento de la cepa modelo en la zona de la gota
+	Presencia de halo de inhibición del tamaño de la gota
++	Presencia de halo de inhibición de mayor tamaño al de la gota

El detalle de los resultados se presenta en la Tabla 4-2. Estos se encuentran separados por género, y por medio de cultivo.

Tabla 4-2 Resultados de Actividad Antimicrobiana con extractos crudos.

Cepa	Género	Medio de Cultivo	Cepa Modelo de interés						
			MILU	LIMO	CLMI	PSAU	ESCO	SAEN	STAU
H-KB5	<i>Kocuria</i> sp.	ISP-1/ASW	-	-	+/-	+	+/-	+/-	-
		ISP-2/ASW	-	-	+/-	+	+/-	+/-	-
		R5A	-	-	-	-	-	-	-
		SM19	-	+/-	+	+	+/-	+/-	+/-
		SG modificado	-	-	-	-	-	+/-	-
H-BE7	<i>Brevibacterium</i> sp.	ISP-1/ASW	+/-	+	++	+	+/-	+	+
		ISP-2/ASW	+/-	+	++	+	+/-	+	+/-
		R5A	+/-	-	++	+	+/-	+	+/-
		SM19	-	-	+	+	+/-	-	-
		SG modificado	-	-	+	+	+/-	-	-
H-JH3	<i>Arthrobacter</i> sp.	ISP-1/ASW	-	-	+	+	+/-	-	-
		ISP-2/ASW	+	+	++	+	+/-	+	+
		R5A	+	+/-	+	+	+/-	+/-	+/-
		SM19	-	-	+	+	+/-	-	-
		SG modificado	-	+	+	+	+/-	+/-	-
H-ED12	<i>Curtobacterium</i> sp.	ISP-1/ASW	+	+	+/-	+	+/-	+/-	+/-
		ISP-2/ASW	+	+	+	+	+/-	+/-	+
		R5A	-	-	-	+	+/-	+/-	-
		SM19	+/-	+	-	+	+	+/-	+/-
		SG modificado	+	+	+	+	+/-	+/-	+
IpEH-1	<i>Brachybacterium</i> sp.	ISP-1/ASW	-	-	-	+/-	-	-	-
		ISP-2/ASW	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-
		R5A	-	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-
		SM19	-	+/-	+	+	+	+/-	-
		SG modificado	+	+/-	-	+	+	+	-

Vc820	<i>Brevibacterium</i> sp.	ISP-1/ASW	+/-	+	-	+	+/-	+/-	-
		ISP-2/ASW	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-	-
		R5A	+/-	+	+/-	+	+/-	+/-	-
		SM19	+	+	+/-	+	+/-	+/-	+
		SG modificado	-	-	+	-	+/-	-	-
VP2-3	<i>Microbacterium</i> sp.	ISP-1/ASW	-	-	++	+/-	-	-	-
		ISP-2/ASW	+/-	+/-	++	+/-	-	-	+/-
		R5A	-	-	+	+/-	-	-	-
		SM19	-	-	-	+/-	-	-	-
		SG modificado	-	-	+	+/-	-	-	-
VO30-3	<i>Arthrobacter</i> sp.	ISP-1/ASW	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-	-
		ISP-2/ASW	+	+	++	+/-	+/-	+/-	+
		R5A	+	+	++	+	+	+	+
		SM19	-	-	-	-	+/-	+/-	-
		SG modificado	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-

En total, se realizaron 315 ensayos antimicrobianos en donde fue posible encontrar actividad contra todas cepas de interés evaluadas. Se destaca especialmente la actividad contra CLMI. Esta última fue la única cepa modelo en la que se obtuvo halos de inhibición mayores a la gota de aplicación (Ver Figura 4-1 y Figura 4-2). También sobresale la actividad contra PSAU, una bacteria patógeno oportunista que en la actualidad es de preocupación mundial por el número cada vez mayor de infecciones asociadas a la atención de la salud, debido a la resistencia que ha adquirido a múltiples fármacos (Maraolo *et al.*, 2017).

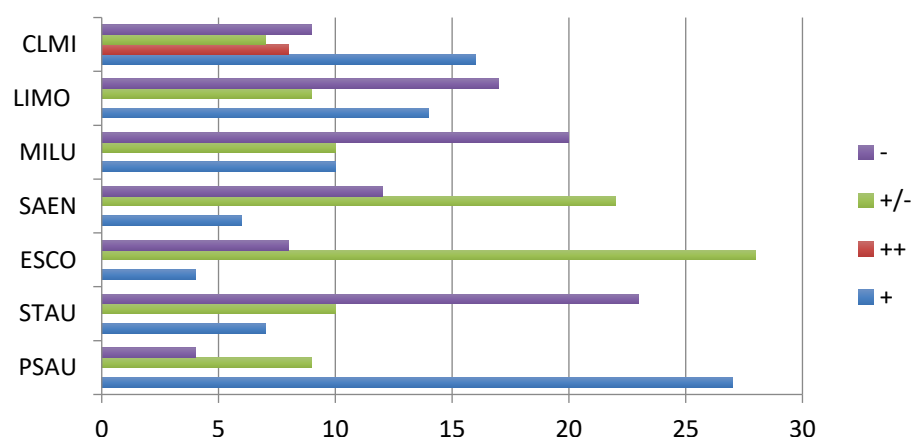


Figura 4-1 Número y tipo de Actividades Antimicrobianas totales obtenidas por Cepa Modelo.

La mayor cantidad de actividades positivas se presentaron con las cepas *Curtobacterium* sp. H-ED12, *Brevibacterium* sp. H-BE7, *Arthrobacter* sp. H-JH3 y *Arthrobacter* sp. VO30-3 (Ver Figura 4-2). Destacan las tres primeras nombradas, cepas originarias del fiordo de Comau, ya que tres de las cuatro evaluadas presentaron gran cantidad de actividades antimicrobianas y sobre todo su acción contra STAU y SAEN, patógenas que en total registraron menores casos de inhibición. La última cepa VO30-3, perteneciente a Valparaíso, se destaca por ser una de las dos únicas actinobacterias que presentaron actividad contra ESCO, y ser la única que demostró efectividad contra todas las cepas modelo analizadas.

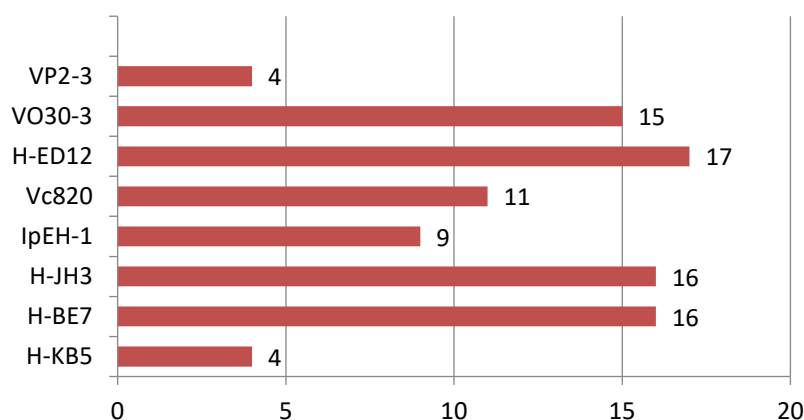


Figura 4-2 Número de actividades con resultado "+" y "++" por Actinobacteria.

Los cinco medios utilizados generaron resultados positivos en proporciones relativamente similares (Ver Figura 4-3). El medio ISP-2/ASW resultó el de mayor efectividad, en todas las cepas se produjo al menos una actividad positiva en este medio. Algunos medios sobresalieron especialmente con algunas cepas. Es el caso del medio SG modificado con la cepa *Brachybacterium* sp. IpEH-1 y el medio R5A con la cepa *Arthrobacter* sp. VO30-3, este último generó actividades positivas contra todas las cepas modelos.

La cepa *Aeromicrobium* sp. VO40-3 presentó problemas en las tres oportunidades en que se le realizó el ensayo, por lo que sus resultados fueron omitidos.

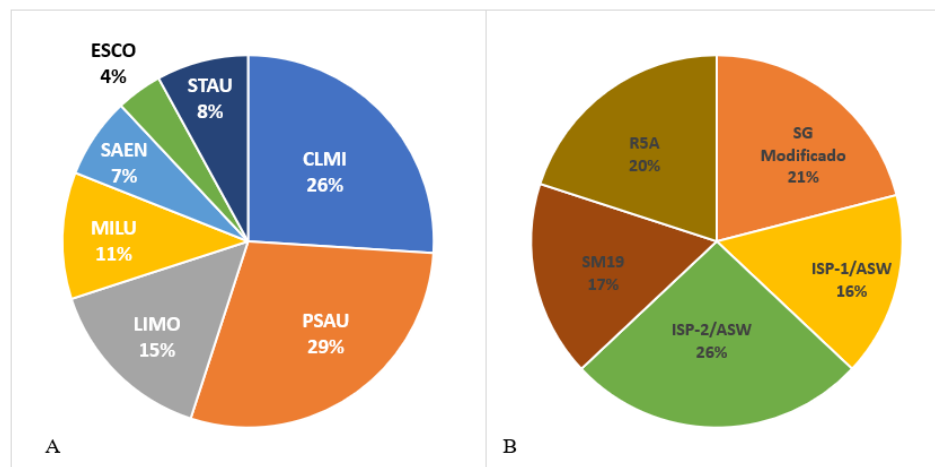


Figura 4-3 Porcentajes de actividades positivas por cepa modelo (A) y medio de cultivo utilizado (B).

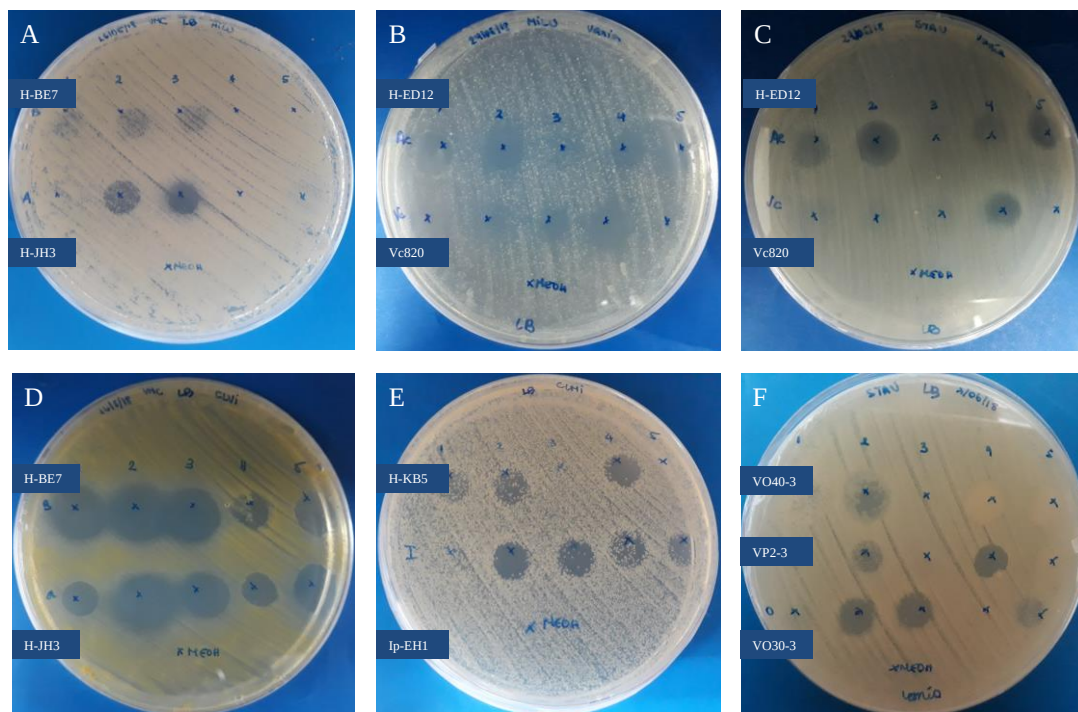


Figura 4-4 Ejemplos de halos de inhibición observados en los ensayos antimicrobianos con extractos crudos desde cultivos con diferentes medios de cultivo (1, ISP-1/ASW; 2, ISP-2/ASW; 3, RSA; 4, SM19 y 5, SG modificado). A) Inhibición contra MILU por *Brevibacterium* sp. H-BE7 y *Arthrobacter* sp. H-JH3. B) Inhibición contra MILU por *Curtobacterium* sp. H-ED12 y *Brevibacterium* Vc820. C) Inhibición contra STAU por *Curtobacterium* sp. H-ED12 y *Brevibacterium* Vc820. D) Inhibición contra CLMI *Brevibacterium* sp. H-BE7 y *Arthrobacter* sp. H-JH3. E) Inhibición contra CLMI por *Kocuria* sp. H-KB5 y *Brachybacterium* Ip-EH-1. F) Inhibición contra STAU por *Aeromicrobium* VO40-3, *Microbacterium* sp. VP2-3 y *Arthrobacter* sp. VO30-3. Se observa que para la cepa VO40-3 el resultado no es concluyente debido a la contaminación en el halo.

4.2 Búsqueda de Productos Naturales (PN)

Cuatro muestras de extractos fueron enviadas a Fundación MEDINA (Granada, España) para su análisis a través de HPLC Agilent 1200 de resolución rápida conectado a un espectrómetro de masas maxis (Bruker). Las muestras consistían en un blanco que en este caso corresponde al medio ISP-2/ASW, y los otros tres, extractos de las cepas en el medio mencionado, del fiordo de Comau: *Kocuria* sp. H-KB5, *Brevibacterium* sp. H-BE7 y *Arthrobacter* sp. H-JH3.

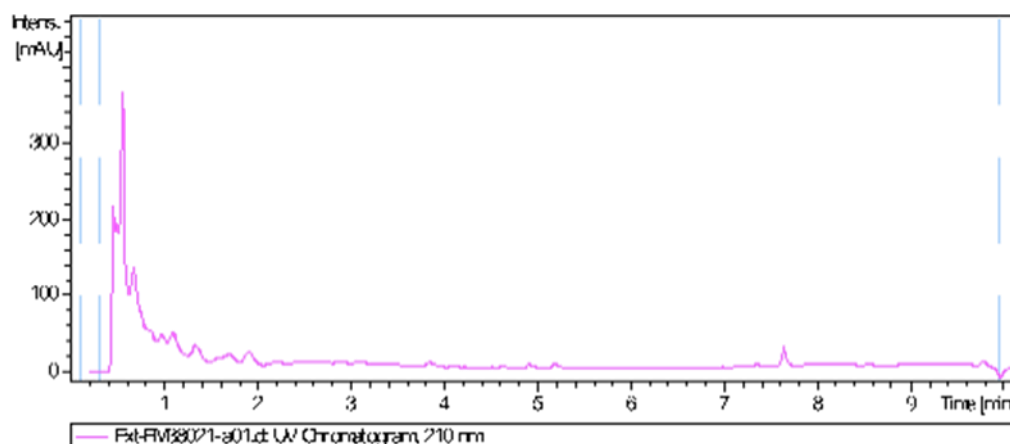


Figura 4-5 Cromatograma del medio ISP-2/ASW.

La muestra del medio ISP-2/ASW (Ver Figura 4-5) corresponde a un blanco (extracción del medio sin fermentar) y por tanto los componentes que se detectan en las otras muestras se compararán con ésta para determinar si son realmente metabolitos secundarios o bien, parte constituyente del medio de fermentación.

4.2.1 Resultados cepa *Arthrobacter* sp. H-JH3.

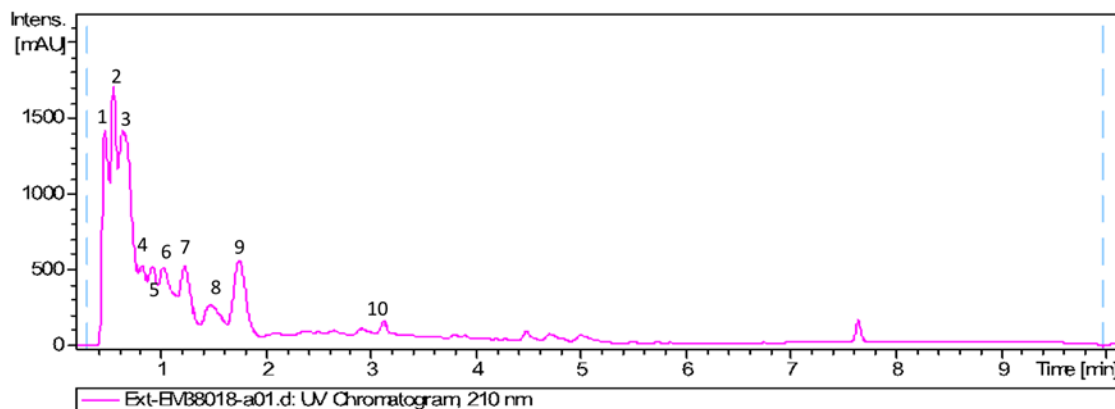


Figura 4-6 Cromatograma cepa H-JH3

Se obtuvieron 10 picos en el cromatograma de los cuales, 9 son productos conocidos, y 1 no fue posible ionizar (pico 1) por lo que no se logró resultados. Entre los 9 reconocidos, el pico 10 destaca por presentar coincidencia con un antibiótico conocido con fórmula molecular $C_{11}H_{15}NO_3$ (Ver Figura 4-7). Además con características de antifúngico que inhibe la síntesis de proteínas (Bycroft and Payne, 2013).

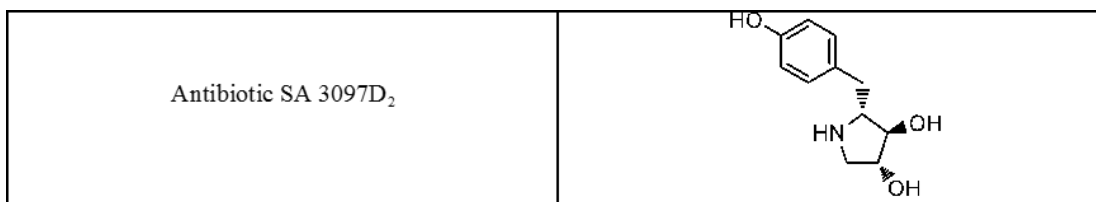


Figura 4-7 Forma Antibiotico cepa H-JH3

4.2.2 Resultados cepa *Brevibacterium* sp. H-BE7.

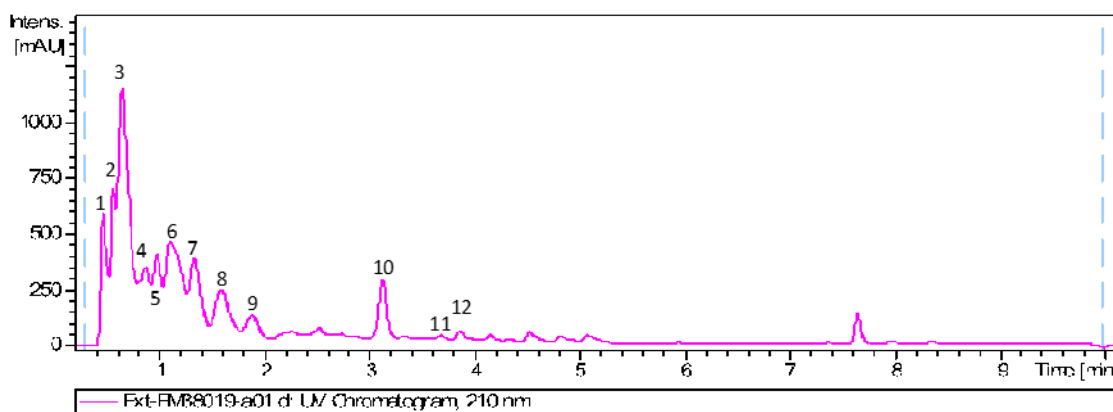


Figura 4-8 Cromatograma cepa H-BE7

Se encontraron 12 picos de los cuales 1 y 2, con fórmula molecular $C_7H_{11}N_3S$, y el pico 11, fórmula $C_{19}H_{16}N_2O$, no presentan coincidencias con la base de datos de Fundación MEDINA ni con el diccionario de productos naturales.

4.2.3 Resultados cepa *Kocuria* sp. H-KB5.

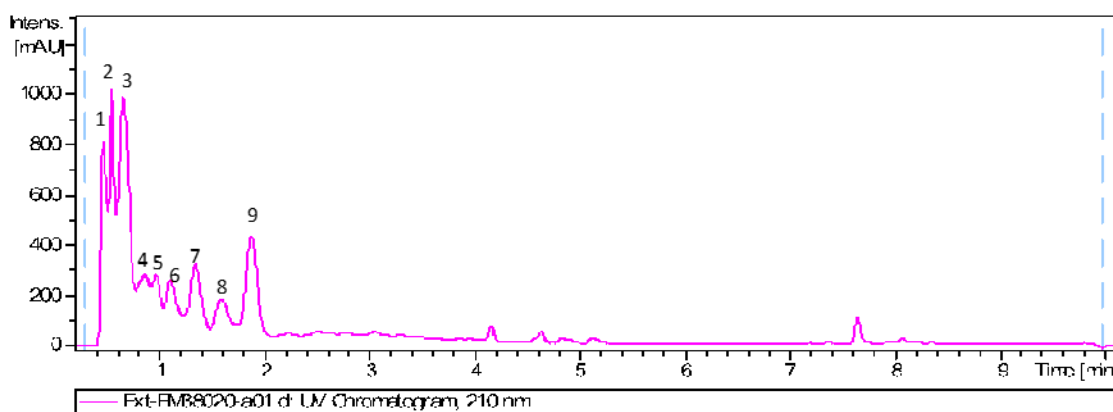


Figura 4-9 Cromatograma cepa H-KB5

Para esta cepa se obtuvieron 9 picos, siendo 2 de éstos completamente nuevos. El pico 1 y el 2 con fórmulas moleculares $C_{11}H_{15}NO_4$ y $C_{10}H_{16}N_2O_3S$ respectivamente.

4.3 Estudio de resistencia de actinobacterias a metales pesados

Para este ensayo, se utilizaron 6 sales de metales: HgCl_2 , CuSO_4 , CoCl_2 , NiSO_4 , NaAsO_2 y K_2CrO_4 diluidas en placas con MM / ASW (Ver Anexo A) para conseguir dos concentraciones finales: 0,02 [mg/mL] y 0,08 [mg/mL]. En total se realizaron 36 ensayos por metal, 18 por cada día estudiado y a dos concentraciones distintas por cada una de las 9 cepas.

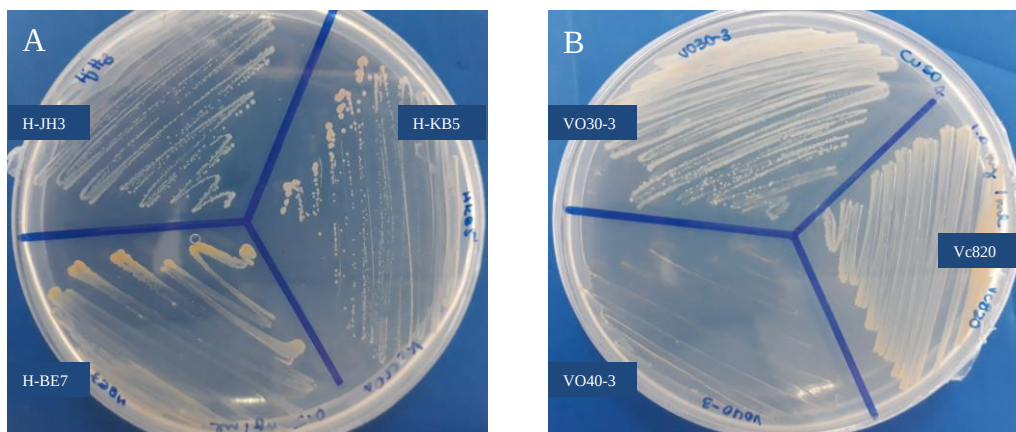


Figura 4-10 Ejemplos de crecimiento de cepas en MM/ASW.

Los resultados obtenidos muestran una gran tolerancia a los metales por parte de todas las cepas, la cual fue analizada a partir de los criterios presentados en la Tabla 4-3. El detalle de los resultados se presenta en la Tabla 4-4. Estos se encuentran separados por género y concentración.

Tabla 4-3 Criterios análisis de resultados potencial de biodegradación metales pesados.

Resultado	Observación
+	No existe inhibición en el crecimiento de las cepas
-	Inhibición en el crecimiento de la cepa

A excepción del mercurio, para el cual ninguna cepa fue capaz de crecer en presencia de él en las concentraciones estudiadas, todas las cepas presentaron resultados positivos (Ver Figura 4-11). Se aprecia que los metales con menor resistencia son el cobre y el cromo.

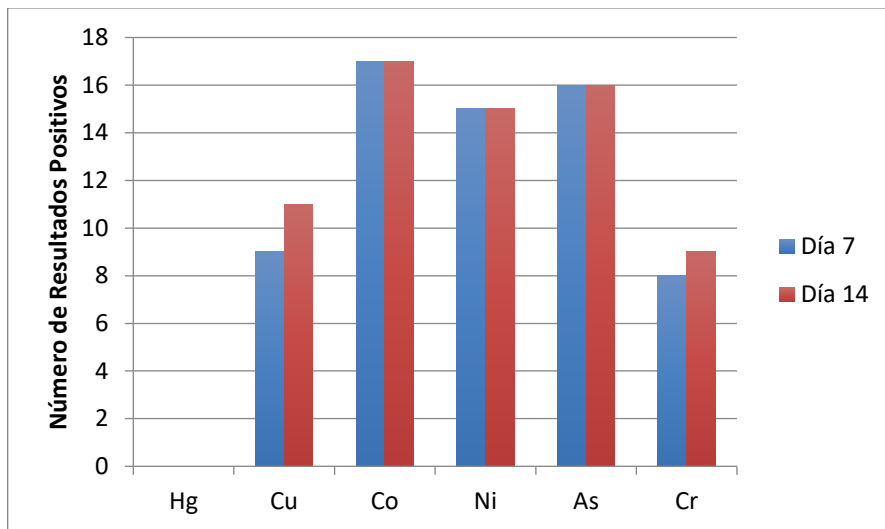


Figura 4-11 Resultados positivos obtenidos por metal y día estudiado.

Al igual que los ensayos antimicrobianos, las cepas provenientes del fiordo de Comau, principalmente *Brevibacterium* sp. H-BE7 y *Arthrobacter* sp. H-JH3, destacan por su resistencia en distintas concentraciones en cinco diferentes metales: Cu, Co, Ni, As y Cr. Las cepas *Brachybacterium* sp. IpEH-1 y *Microbacterium* sp. VP2-3 demostraron ser las más sensibles a los metales.

Tabla 4-4 Resultados de crecimiento de cepas con Metales Pesados.

Cepa	Género	Concentración [mg/mL]	Metales											
			Hg		Cu		Co		Ni		As		Cr	
			Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día	Día
			7	14	7	14	7	14	7	14	7	14	7	14
H-KB5	<i>Kocuria</i> sp.	0,02	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		0,08	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
H-BE7	<i>Brevibacterium</i> sp.	0,02	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		0,08	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H-JH3	<i>Arthrobacter</i> sp.	0,02	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		0,08	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H-ED12	<i>Curtobacterium</i> sp.	0,02	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
		0,08	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
IpEH-1	<i>Brachybacterium</i> sp.	0,02	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
		0,08	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Vc820	<i>Brevibacterium</i> sp.	0,02	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		0,08	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP2-3	<i>Microbacterium</i> sp.	0,02	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
		0,08	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
VO30-3	<i>Arthrobacter</i> sp.	0,02	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
		0,08	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
VO40-3	<i>Aeromicrobium</i> sp.	0,02	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		0,08	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-

5 Discusión

La resistencia antimicrobiana cada vez gana más atención como una de las mayores amenazas para la prevención y tratamiento de un número creciente de enfermedades infecciosas. Debido a lo anterior, se busca con urgencia nuevos compuestos que puedan superar la resistencia cruzada con antibióticos conocidos (Hug *et al.*, 2018).

En particular, el género *Streptomyces* ha proporcionado numerosas moléculas bioactivas novedosas, no solo antibióticos, sino también antifúngicos, antiprotozoarios y antivirales. Sin embargo, el descubrimiento de nuevos fármacos derivados de metabolitos secundarios de estreptomicetos ha ido disminuyendo constantemente, lo que se reflejó en una caída del 30% de fármacos basados en productos naturales en estudios clínicos entre 2001 y 2008 (Li and Vederas, 2009). La investigación de productos naturales fue ampliamente abandonada por la industria farmacéutica debido a graves problemas de redescubrimiento.

En respuesta a las crecientes necesidades de la medicina para nuevos compuestos antimicrobianos, el enfoque en el descubrimiento de productos naturales se desplazó hacia hábitats poco explorados, especialmente en ambientes marinos y extremos. De manera alentadora, los géneros raros de actinomicetos, en general considerados como no estreptomicetos, y los nuevos aislados de *Streptomyces* encontrados en estos hábitats ya han permitido el descubrimiento de nuevos antimicrobianos con estructuras químicas únicas, lo que confirma que los productos naturales microbianos siguen siendo una fuente prometedora para el descubrimiento de fármacos (Luzhetskyy *et al.*, 2007).

5.1 Potencial de Producción de compuestos Bioactivos

En este estudio se evaluó la capacidad de producción de compuestos bioactivos de cepas aisladas de muestras de sedimentos marinos de Valparaíso, Rapa Nui y Fiordo de Comau, a través de ensayos con extractos crudos. Para escoger las bacterias, se realizó una selección basada en los ensayos previamente realizados en el laboratorio, y en los resultados obtenidos a partir de estos. Se seleccionaron cepas distintas al género *Streptomyces* que presentaran resultados positivos en los antibiogramas contra cepas modelos de interés. En total, se seleccionaron 9 cepas

pertenecientes a 7 géneros distintos: *Aeromicrobium*, *Arthrobacter*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Curtobacterium*, *Kocuria*, y *Microbacterium*.

Con las cepas seleccionadas se obtuvieron extractos crudos a partir del sobrenadante obtenidos desde las fermentaciones, realizando extracciones con acetato de etilo, los cuales fueron posteriormente puestos a prueba contra 6 cepas modelo de interés clínico y 1 de interés agrícola: *Staphylococcus aureus* (STAU), *Listeria monocytogenes* (LIMO), *Micrococcus luteus* (MILU), *Escherichia coli* (ESCO), *Pseudomonas aeruginosa* (PSAU), *Salmonella enterica* (SAEN) y *Clavibacter michiganensis* (CLMI).

Se obtuvieron resultados positivos con todas las cepas a excepción de la cepa VO40-3 perteneciente al género *Aeromicrobium* y aislada desde la costa de Valparaíso. Esta última presentó problemas las tres veces que se repitió su proceso de extracción exhibiendo presencia de contaminación en las placas finales. Para todas las demás cepas, fue posible observar inhibición en un 29% PSAU, 26% CLMI, 15% en LIMO, 11% en MILU, 8% STAU, 7% SAEN y finalmente, sólo un 4% en ESCO. Las últimas dos cepas modelos utilizadas mencionadas, que además son las con menores porcentajes de inhibición, son bacterias Gram negativas. Estas de por si son intrínsecamente resistentes a muchos antibióticos, por lo que el descubrimiento de nuevos compuestos efectivos contra ellas es un gran desafío (Zgurskaya *et al.*, 2015). Es por esto que, a pesar de ser porcentajes menores, es altamente valorable obtener cepas capaces de inhibir este tipo de bacterias. Las cepas H-ED12 y VO30-3, pertenecientes a los géneros *Curtobacterium* y *Arthrobacter* respectivamente, fueron las únicas en presentar resultados positivos de inhibición contra ESCO en uno solo de los medios estudiados, SM19 y R5A correspondientemente. Esto recalca la importancia de probar nuevos medios que le entreguen distintas condiciones de crecimiento a la cepa de estudio. Es ampliamente conocido que la composición de los medios tiene un gran impacto en la producción de los metabolitos microbianos secundarios (Antoraz *et al.*, 2015).

Para la bacteria modelo de interés clínico SAEN, hubo una cepa en específico que sobresalió por su actividad antibacteriana, la cepa H-BE7 perteneciente al género *Brevibacterium*, y aislada desde el fiordo de Comau. Esta presentó la mayor cantidad de inhibiciones, en 3 de los 5 medios evaluados, ISP-1/ASW, ISP-2/ASW y R5A. Previamente se había demostrado que el hábitat marino muestreado en la Patagonia Norte de Chile era un escenario prometedor con resultados positivos en ensayos antimicrobianos realizados (Undabarrena *et al.*, 2016).

5.1.1 Producción en cepas del mismo género

Las cepas del género *Arthrobacter*, H-JH3 y VO30-3, pertenecientes al fiordo de Comau Valparaíso respectivamente, presentaron resultados bastante similares y positivos pese a la lejanía de su proveniencia (Ver Tabla 5-1). Esto indica un género con similares características, excluyente de su hábitat. Estas cepas presentaron la mayor cantidad de resultados positivos y contra todas las patógenas modelos.

Tabla 5-1 Comparación cepas VO30-3 y H-JH3

Cepa Modelo	Cepa <i>Arthrobacter</i>	ISP-1/ASW	ISP-2/ASW	R5A	SM-19	SG Modificado
MILU	H-JH3	-	+	+	-	-
	VO30-3	+/-	+	+	-	+
LIMO	H-JH3	-	+	+/-	-	+
	VO30-3	+/-	+	+	-	+
CLMI	H-JH3	+	++	+	+	+
	VO30-3	+	++	++	-	+
PSAU	H-JH3	+	+	+	+	+
	VO30-3	+/-	+/-	+	-	+/-
ESCO	H-JH3	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	VO30-3	+/-	+/-	+	+/-	+/-
SAEN	H-JH3	-	+	+/-	-	+/-
	VO30-3	+/-	+/-	+	+/-	+/-
STAU	H-JH3	-	+	+/-	-	-
	VO30-3	-	+	+	-	+/-

Al contrario de las cepas del género *Arthrobacter*, el género *Brevibacterium* parece si depender su producción de compuestos según su hábitat de procedencia. Por lo que cada cepa es única y distinta. Esto se pudo apreciar principalmente contra LIMO, CLMI, SAEN y STAU (Ver Tabla 5-2). En el caso de las actividades contra CLMI y SAEN, se puede observar que la cepa H-BE7 presenta inhibición en todos los casos, mientras que la cepa de Valparaíso, Vc820 no lo hace. En el caso de LIMO es posible ver que las cepas presentan afinidad con distintos medios. Mientras

que la cepa H-BE7 indica resultados positivos exclusivamente con los medios ISP-1/ASW y ISP-2/ASW, la cepa Vc820 presenta además correspondencia con los medios R5A y SM19. Finalmente STAU, resulta ser la cepa modelo más difícil de combatir para este género, presentando solo un resultado definido de inhibición por cepa evaluada. Se debe destacar que al igual que en la evaluación con las demás cepas de interés, existe una clara afinidad de la cepa provenientes de Fiordo de comau, H-BE7, por los medios ISP.

El género *Brevibacterium* se encuentra presente en ambientes terrestres y acuáticos. Los principales reportes sobre este género se han tratado de aislados provenientes de la tierra, donde se sabe que producen compuestos antimicrobianos pero solo contra bacterias Gram positivas. Sin embargo, estudios de muestras marinas de este género han demostrado que éstas son capaces de inhibir los patógenos Gram negativos (Al-Zereini, 2014), como lo demuestra también este estudio.

Tabla 5-2 Comparación cepas H-BE7 y Vc820

Cepa Modelo	Cepa <i>Brevibacterium</i>	ISP-1/ASW	ISP-2/ASW	R5A	SM-19	SG Modificado
MILU	H-BE7	+/-	+/-	+/-	-	-
	Vc820	+/-	+/-	+/-	+	-
LIMO	H-BE7	+	+	-	-	-
	Vc820	+	+/-	+	+	-
CLMI	H-BE7	++	++	++	+	+
	Vc820	-	+	+/-	+/-	+
PSAU	H-BE7	+	+	+	+	+
	Vc820	+	+	+	+	-
ESCO	H-BE7	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	Vc820	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
SAEN	H-BE7	+	+	+	-	-
	Vc820	+/-	+/-	+/-	+/-	-
STAU	H-BE7	+	+/-	+/-	-	-
	Vc820	-	-	-	+	-

5.1.2 Inhibición de *Clavibacter michiganensis* (CLMI)

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (Cmm) es la causante del cancro del tomate, enfermedad que puede considerarse como el padecimiento bacteriano más importante de la especie, causando importantes pérdidas económicas en todo el mundo (Gartemann *et al.*, 2003). El control de esta enfermedad suele ser el uso de antibióticos, cuyos compuestos se han suspendido en algunos países de la Unión Europea debido a su impacto en el medio ambiente. Además estos tratamientos han demostrado poca eficacia en Cmm, por lo tanto, la búsqueda de nuevos productos para combatir esta enfermedad, así como para resolver el problema de la resistencia bacteriana es esencial (Flores *et al.*, 2018).

Este estudio demuestra que las actinobacterias marinas poseen un gran potencial de producir compuestos bioactivos contra CLMI. Todas las cepas estudiadas presentaron resultados positivos (Ver Tabla 5-3), además fue la única patógena modelo que presentó halos mayores a la gota de inhibición. Destacaron cuatro cepas en particular: *Brevibacterium* sp. H-BE7, *Arthrobacter* sp. H-JH3, *Arthrobacter* sp. VO30-3 y *Microbacterium* sp.VP2-3.

Tabla 5-3 Resultados contra CLMI

Cepa	ISP-1/ASW	ISP-2/ASW	R5A	SM19	SG Modificado
H-KB5	+/-	+/-	-	+	-
H-BE7	++	++	++	+	+
H-JH3	+	++	+	+	+
IpEH-1	-	+/-	+/-	+	-
Vc820	-	+	+/-	+/-	+
H-ED12	+/-	+	-	-	+
VO30-3	+	++	++	-	+
VP2-3	++	++	+	-	+

5.1.3 Resultados *Pseudomonas aeruginosa* (PSAU)

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista que presenta un desafío terapéutico debido a la alta tasa de morbilidad y mortalidad asociada con él y la posibilidad de desarrollar resistencia a los medicamentos durante la terapia. Los regímenes estándar de antibióticos contra PSAU se están volviendo cada vez más ineficaces debido al aumento de la resistencia a los medicamentos. Solo en los Estados Unidos se producen alrededor de 51,000 infecciones relacionadas con la asistencia médica por PSAU, de las cuales aproximadamente 6000 (13%) son causadas por cepas de *P. aeruginosa* resistentes a múltiples fármacos (MDR) que representan aproximadamente 400 muertes cada año (Chatterjee *et al.*, 2016). La búsqueda de nuevos compuestos para esta bacteria se encuentra con prioridad 1 según la Organización Mundial de la Salud.

Los resultados obtenidos contra PSAU pone en duda la veracidad en ellos debido a la gran cantidad de inhibiciones positivas y a las actividades poco variantes entre cepa y cepa (Ver Tabla 5-4). Además, *P. aeruginosa* es una bacteria Gram negativa, que como se ha mencionado anteriormente, son mucho más difíciles de abordar.

Tabla 5-4 Resultados contra PSAU

Cepa	ISP-1/ ASW	ISP-2/ ASW	R5A	SM19	SG Modificado
H-KB5	+	+	-	+	-
H-BE7	+	+	+	+	+
H-JH3	+	+	+	+	+
IpEH-1	+/-	+	+	+	+
Vc820	+	+	+	+	-
H-ED12	+	+	+	+	+
VO30-3	+/-	+/-	+	-	+/-
VP2-3	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

5.2 Nuevos Productos Naturales

Los productos naturales poseen una enorme diversidad estructural y química que no puede ser igualada por ninguna biblioteca sintética de moléculas pequeñas y continúa inspirando nuevos descubrimientos en química, biología y medicina. Se optimizan evolutivamente como moléculas similares a las de los medicamentos y siguen siendo las mejores fuentes de medicamentos (Shen, 2015).

Se obtuvieron cuatro cromatogramas a partir de las muestras enviadas a Fundación MEDINA. Tres de estos pertenecientes a tres de las cepas originarios del fiordo de Comau: H-JH3 (*Arthrobacter*), H-BE7 (*Brevibacterium*) y H-KB5 (*Kocuria*). La cuarta muestra corresponde a un blanco del medio en común ISP-2/ASW. Los resultados muestran la presencia de compuestos desconocidos para la base de datos, y posibles, nuevos productos naturales.

Previamente se ha descrito la capacidad de producción de nuevos compuestos naturales a partir de los géneros *Arthrobacter*, un antibiótico de quinolona con actividad contra bacterias Gram positivas (Kamigiri *et al.*, 1996), y *Kocuria*. De este último se conoce la producción del compuesto bioactivo *kocurin*, capaz de combatir STAU resistente a la metilicina (Palomo *et al.*, 2013).

5.3 Potencial de Biorremediación de metales pesados

La contaminación ambiental causada por metales pesados ha afectado negativamente al ecosistema natural del hombre. Estos contaminantes provienen de fuentes antropogénicas y desastres naturales como huracanes y erupciones volcánicas. Los metales tóxicos podrían acumularse en los suelos agrícolas y entrar en la cadena alimentaria, convirtiéndose así en una gran amenaza para la seguridad alimentaria.

Los métodos convencionales y físicos para remediar son costosos y no son efectivos en áreas con baja toxicidad por metales. La biorremediación es, por lo tanto, un método ecológico y eficiente para recuperar ambientes contaminados con metales pesados mediante el uso de los mecanismos biológicos inherentes de los microorganismos para erradicar contaminantes peligrosos (Ojuederie and Babalola, 2017).

A modo de evaluar la capacidad inicial de biorremediación de las cepas se realizó un ensayo contra 6 metales: cobre (Cu), cobalto (Co), níquel (Ni), arsénico (As), cromo (Cr) y mercurio (Hg). Se obtuvo resultados positivos para todas las cepas y contra todos los metales, a excepción del mercurio, donde no fue posible presenciar crecimiento de las cepas, confirmando así la toxicidad de este metal. El mercurio es un importante contaminante ambiental, clasificado entre las toxinas bioacumulables que persisten en el medio ambiente por largos períodos (Dash and Das, 2012).

Las cepas que presentan mayor potencial son las dos pertenecientes al género *Brevibacterium*, capaces de crecer en todos los metales, a excepción del mercurio, en ambas concentraciones utilizadas. Previamente ya existen estudios que demuestran que las cepas marinas de este género poseen mecanismos de resistencia para metales pesados tóxicos y son capaces de eliminar activamente los metales de sus alrededores (De *et al.*, 2008). Otra cepa que destaco fue H-JH3, perteneciente al género *Arthrobacter*, y aislada desde el fiordo de Comau. Este género ha sido descrito previamente con un gran potencial para la remediación de sitios contaminados con metales pesados, ya que no solo los bioacumula, sino que también reduce y desintoxica los metales activos como el Cr y Hg (Bafana *et al.*, 2010). La otra cepa evaluada referente al género, VO30-3, no logró los mismos resultados. Por lo tanto, y sumándose a los resultados antimicrobianos, es posible reafirmar la posibilidad de que este género sea considerablemente más sensible a su hábitat.

Las cepas que resultaron más sensibles a los metales fueron las cepas VP2-3 e IpEH-1 pertenecientes a los géneros *Microbacterium* y *Brachybacterium*, respectivamente. Estos géneros presentan poca información previa. Pero se ha reportado en relación al primero que su genoma podría presentar genes involucrados con la resistencia a metales pesados (Karimi *et al.*, 2017). Del segundo género, se demostró su capacidad de adsorción de metales por sus capacidades de oxidar manganeso (Wang *et al.*, 2013). Debido a la escasa información de estos géneros este estudio presenta información extra relevante.

6 Conclusiones y Proyecciones

6.1 Conclusiones

A partir de los ensayos efectuados con el objetivo de evaluar el potencial de actinobacterias marinas no miceliales, y los análisis hechos con respecto a los resultados obtenidos, se puede concluir del estudio:

- Las actinobacterias seleccionadas presentan potencial de producción de compuestos antimicrobianos y capacidad de biorremediación de metales pesados. Esto demuestra la importancia de muestrear en lugares poco explorados.
- Las cepas distintas al género *Streptomyces* presentan un gran potencial de producción de metabolitos secundarios, incluso en bacterias Gram negativas.
- Los lugares poco explorados como el fiordo de Comau representa un nicho rico en actinobacterias con gran potencial.
- Con los resultados obtenidos contra *Clavibacter michiganensis* es posible afirmar la facultad de utilizar las actinobacterias marinas para usos en la industria agrícola.

6.2 Proyecciones

Debido al gran potencial agrícola que presentaron las cepas estudiadas, se plantea profundizar y seguir los estudios contra esta patógena modelo en otras actinobacterias raras disponibles en el cepario del laboratorio.

Por otra parte, con los resultados obtenidos por la cepa *Brevibacterium* sp. H-BE7, los cuales reflejaron ser considerablemente positivos tanto para actividad antimicrobiana y potencial de biorremediación, y al comprobar que la cepa H-BE7 es capaz de producir moléculas no identificadas según los datos obtenidos en esta tesis, se sugiere profundizar los estudios de actividad antimicrobiana de la cepa. Al ser distinta al género *Streptomyces* y de un lugar poco invadido por el hombre, el fiordo de Comau, presenta la característica de novedosa. Además, esta bacteria se encuentra recientemente con su genoma secuenciada.

7 Referencias

- Adegboye, M. F. and Babalola, O. O. (2013) *Actinomycetes: a yet inexhaustive source of bioactive secondary metabolites*. Available at:
<http://www.formatex.info/microbiology4/vol2/786-795.pdf> .
- Alvarez, A. *et al.* (2017) ‘Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals’, *Chemosphere*, 166, pp. 41–62. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.09.070.
- Amoroso, M. J. *et al.* (1998) ‘Screening of heavy metal-tolerant actinomycetes isolated from the Salí River.’, *The Journal of general and applied microbiology*, 44(2), pp. 129–132. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12501279>
- Andino, A. and Hanning, I. (2015) ‘*Salmonella enterica* : Survival, Colonization, and Virulence Differences among Serovars’, *The Scientific World Journal*, 2015, pp. 1–16. doi: 10.1155/2015/520179.
- Ansari, T. M., Marr, I. L. and Tariq, N. (2004) ‘Heavy Metals in Marine Pollution Perspective—A Mini Review’, *Journal of Applied Sciences*, 4(1), pp. 1–20. doi: 10.3923/jas.2004.1.20.
- Antoraz, S. *et al.* (2015) ‘Toward a new focus in antibiotic and drug discovery from the *Streptomyces* arsenal.’, *Frontiers in microbiology*. Frontiers Media SA, 6, p. 461. doi: 10.3389/fmicb.2015.00461.
- Azman, A.-S. *et al.* (2015) ‘Mangrove rare actinobacteria: taxonomy, natural compound, and discovery of bioactivity.’, *Frontiers in microbiology*. Frontiers Media SA, 6, p. 856. doi: 10.3389/fmicb.2015.00856.
- Bafana, A. *et al.* (2010) ‘Heavy metal resistance in *Arthrobacter ramosus* strain G2 isolated from mercuric salt-contaminated soil’, *Journal of Hazardous Materials*, 177(1–3), pp. 481–486. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.12.058.
- Barka, E. A. *et al.* (2016) ‘Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria.’, *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. American Society for Microbiology, 80(1), pp. 1–43. doi: 10.1128/MMBR.00019-15.

- El Baz, S. *et al.* (2015) 'Resistance to and Accumulation of Heavy Metals by Actinobacteria Isolated from Abandoned Mining Areas', *The Scientific World Journal*, 2015, pp. 1–14. doi: 10.1155/2015/761834.
- El Baz, S. (2017) 'BIOREMEDIATION OF HEAVY METALS BY ACTINOBACTERIA: REVIEW', *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*, 5(5), pp. 359–369.
- Becerril, A. *et al.* (2018) 'Uncovering production of specialized metabolites by *Streptomyces argillaceus*: Activation of cryptic biosynthesis gene clusters using nutritional and genetic approaches', *PLOS ONE*. Edited by M.-J. Virolle. Public Library of Science, 13(5), p. e0198145. doi: 10.1371/journal.pone.0198145.
- Behie, S. W. *et al.* (2016) 'Molecules to Ecosystems: Actinomycete Natural Products In situ.', *Frontiers in microbiology*. Frontiers Media SA, 7, p. 2149. doi: 10.3389/fmicb.2016.02149.
- Benndorf, R. *et al.* (2018) 'Natural Products from Actinobacteria Associated with Fungus-Growing Termites', *Antibiotics*. doi: 10.3390/antibiotics7030083.
- Bérdy, J. (2005) 'Bioactive Microbial Metabolites', *The Journal of Antibiotics*, 58(1), pp. 1–26. doi: 10.1038/ja.2005.1.
- Bhatnagar, I. and Kim, S.-K. (2010) 'Immense essence of excellence: marine microbial bioactive compounds.', *Marine drugs*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 8(10), pp. 2673–701. doi: 10.3390/md8102673.
- Bishop, E. J. and Howden, B. P. (2007) 'Treatment of *Staphylococcus aureus* infections: new issues, emerging therapies and future directions', *Expert Opinion on Emerging Drugs*. Taylor & Francis, 12(1), pp. 1–22. doi: 10.1517/14728214.12.1.1.
- Blunt, J. W. *et al.* (2004) 'Marine natural products', *Natural Product Reports*, 21(1), p. 1. doi: 10.1039/b305250h.
- Bredholdt, H. *et al.* (2007) 'Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity', *Environmental Microbiology*. Wiley/Blackwell (10.1111), 9(11), pp. 2756–2764. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01387.x.
- Bull, A. T. and Stach, J. E. M. (2007) 'Marine actinobacteria: new opportunities for natural

product search and discovery', *Trends in Microbiology*, 15(11), pp. 491–499. doi: 10.1016/j.tim.2007.10.004.

Bycroft, B. W. (Barrie W. . and Payne, D. J. (2013) *Dictionary of antibiotics and related substances with CD-ROM*.

Carlet, J. *et al.* (2011) 'Society's failure to protect a precious resource: antibiotics', *The Lancet*, 378(9788), pp. 369–371. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60401-7.

Chatterjee, M. *et al.* (2016) 'Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options', *International Journal of Medical Microbiology*, 306(1), pp. 48–58. doi: 10.1016/j.ijmm.2015.11.004.

Claverías, F. P. *et al.* (2015) 'Culturable diversity and antimicrobial activity of Actinobacteria from marine sediments in Valparaíso bay, Chile', *Frontiers in Microbiology*. doi: 10.3389/fmicb.2015.00737.

Colegio Médico de Chile (no date) *Contaminación y Salud Región de Valparaíso 2018*. Available at: <http://www.colegiomedico.cl/wp-content/uploads/2018/05/Contaminacion-y-Salud-2018.pdf>

Cumsille, A. (2015) *Biodiversidad y Actividad Antibacteriana de Actinobacterias aisladas desde Sedimentos y Esponjas Marinas*. Universidad Técnica Federico Santa María.

Cumsille, A. *et al.* (2017) 'Biodiversity of actinobacteria from the South Pacific and the assessment of *Streptomyces* chemical diversity with metabolic profiling', *Marine Drugs*. doi: 10.3390/md15090286.

Dash, H. R. and Das, S. (2012) 'Bioremediation of mercury and the importance of bacterial mer genes', *International Biodeterioration & Biodegradation*. Elsevier, 75, pp. 207–213. doi: 10.1016/J.IBIOD.2012.07.023.

De, J., Ramaiah, N. and Vardanyan, L. (2008) 'Detoxification of toxic heavy metals by marine bacteria highly resistant to mercury', *Marine Biotechnology*. doi: 10.1007/s10126-008-9083-z.

Debbab, A. *et al.* (2010) 'Bioactive Compounds from Marine Bacteria and Fungi', *Microbial Biotechnology*. Wiley/Blackwell (10.1111), 3(5), pp. 544–563. doi: 10.1111/j.1751-7915.2010.00179.x.

- Demain, A. L. and Fang, A. (2000) 'The Natural Functions of Secondary Metabolites', in. doi: 10.1007/3-540-44964-7_1.
- Dias, D. A., Urban, S. and Roessner, U. (2012) 'A Historical overview of natural products in drug discovery', *Metabolites*. doi: 10.3390/metabo2020303.
- Dilip, C. V, S, M. S. and Mohalkar, R. (2013) 'A REVIEW ON ACTINOMYCETES AND THEIR BIOTECHNOLOGICAL APPLICATION', *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4(5), p. 1730. Available at: www.ijpsr.com
- Domingo, J. L. (1989) 'Cobalt in the environment and its toxicological implications.', *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 108, pp. 105–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2646660>
- Donia, M. and Hamann, M. T. (2003) *Anti-infectives from the sea Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents*, *THE LANCET Infectious Diseases*. Available at: <http://infection.thelancet.com>338.
- Duca, G. *et al.* (2012) 'BIORREMEDIACION DE NIQUEL (II) EN SOLUCION ACUOSA POR *Aspergillus niger* GC1', *Boletín Micológico*, 27(1). doi: 10.22370/bolmicol.2012.27.1.889.
- Eng, S.-K. *et al.* (2015) '*Salmonella* : A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance', *Frontiers in Life Science*. Taylor & Francis, 8(3), pp. 284–293. doi: 10.1080/21553769.2015.1051243.
- Escher, S. K. S. *et al.* (2016) 'Influence of glucose and stirring in the fermentation process in order to produce anti- *Candida* metabolites produced by *Streptomyces* sp.', *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 52(2), pp. 265–272. doi: 10.1590/S1984-82502016000200004.
- Fenical, W. and Jensen, P. R. (2006) 'Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria', *Nature Chemical Biology*. Nature Publishing Group, 2(12), pp. 666–673. doi: 10.1038/nchembio841.
- Fernández, E. *et al.* (1998) 'Identification of two genes from *Streptomyces argillaceus* encoding glycosyltransferases involved in transfer of a disaccharide during biosynthesis of the antitumor drug mithramycin.', *Journal of bacteriology*, 180(18), pp. 4929–37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9733697>

- Flaño Ipinza, A. (2013) *Situación del tomate para consumo fresco*. Available at: www.odepa.gob.cl
- Flores, J. B. *et al.* (2018) 'EFFECT OF ESSENTIAL OILS IN THE CONTROL OF THE *Clavibacter michiganensis* SUBESPECIE *michiganensis* IN TOMATO (*Lycopersicum esculentum* L.) PLANTS', *Biotechnia*, 20(3), pp. 96–101. doi: 10.18633/BIOTECNIA.V20I3.704.
- Founou, R. C., Founou, L. L. and Essack, S. Y. (2017) 'Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: A systematic review and meta-analysis', *PLOS ONE*. Edited by P. Butaye, 12(12), p. e0189621. doi: 10.1371/journal.pone.0189621.
- Friedman, N. D., Temkin, E. and Carmeli, Y. (2016) 'The negative impact of antibiotic resistance', *Clinical Microbiology and Infection*, 22(5), pp. 416–422. doi: 10.1016/j.cmi.2015.12.002.
- Gao, B. and Gupta, R. S. (2012) 'Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria.', *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. American Society for Microbiology (ASM), 76(1), pp. 66–112. doi: 10.1128/MMBR.05011-11.
- Gartemann, K.-H. *et al.* (2003) 'Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium.', *Journal of biotechnology*, 106(2–3), pp. 179–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14651860>
- González, V. (2015) *Aislamiento Y Caracterización De Actinobacterias Marinas Y De Ambientes Extremos Y Búsqueda De Su Potencial Rol En Biotecnología*. Universidad Técnica Federico Santa María.
- Goodfellow, M. and Williams, S. T. (1983) 'Ecology of Actinomycetes', *Annual Review of Microbiology*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA , 37(1), pp. 189–216. doi: 10.1146/annurev.mi.37.100183.001201.
- Haber, M. and Ilan, M. (2014) 'Diversity and antibacterial activity of bacteria cultured from Mediterranean *Axinella* spp. sponges', *Journal of Applied Microbiology*. Wiley/Blackwell (10.1111), 116(3), pp. 519–532. doi: 10.1111/jam.12401.
- Hamed, J., Dehghani, M. and Mohammadian, F. (2015) 'Isolation of Extremely Heavy Metal

- Resistant Strains of Rare Actinomycetes from High Metal Content Soils in Iran', *Int. J. Environ. Res*, 9(2), pp. 475–480. Available at: https://ijer.ut.ac.ir/article_920_aef08becf144d74d75ca6c3f08d1ef68.pdf (Accessed: 8 October 2018).
- Hong, Y.-S., Kim, Y.-M. and Lee, K.-E. (2012) 'Methylmercury Exposure and Health Effects', *Journal of Preventive Medicine & Public Health*, 45(6), pp. 353–363. doi: 10.3961/jpmph.2012.45.6.353.
- Hrvatin, V. (2017) 'Combating antibiotic resistance: New drugs or alternative therapies?', *Canadian Medical Association Journal*, 189(37), pp. E1199–E1199. doi: 10.1503/cmaj.109-5469.
- Hu, Y. *et al.* (2015) 'Statistical research on the bioactivity of new marine natural products discovered during the 28 years from 1985 to 2012.', *Marine drugs*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 13(1), pp. 202–21. doi: 10.3390/md13010202.
- Hug, J. *et al.* (2018) 'Concepts and Methods to Access Novel Antibiotics from Actinomycetes', *Antibiotics*. doi: 10.3390/antibiotics7020044.
- Ivanina, A. V. and Sokolova, I. M. (2015) 'Interactive effects of metal pollution and ocean acidification on physiology of marine organisms', *Current Zoology*. Oxford University Press, 61(4), pp. 653–668. doi: 10.1093/czoolo/61.4.653.
- Jensen, P. R., Moore, B. S. and Fenical, W. (2015) 'The marine actinomycete genus *Salinispora*: a model organism for secondary metabolite discovery.', *Natural product reports*, 32(5), pp. 738–51. doi: 10.1039/c4np00167b.
- Jiang, Y. *et al.* (2016) 'Isolation and Cultivation Methods of Actinobacteria', in *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*. InTech. doi: 10.5772/61457.
- JORQUERA-JARAMILLO, C. *et al.* (2012) 'Conservación de la biodiversidad en Chile: Nuevos desafíos y oportunidades en ecosistemas terrestres y marinos costeros', *Revista chilena de historia natural*. Sociedad de Biología de Chile, 85(3), pp. 267–280. doi: 10.4067/S0716-078X2012000300002.
- Kamigiri, K. *et al.* (1996) 'YM-30059, a novel quinolone antibiotic produced by *Arthrobacter* sp.', *The Journal of antibiotics*, 49(8), pp. 823–5. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8823519>

Kaper, J. B., Nataro, J. P. and Mobley, H. L. T. (2004) 'Pathogenic *Escherichia coli*', *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), pp. 123–140. doi: 10.1038/nrmicro818.

Karimi, E. *et al.* (2017) 'Draft Genome Sequence of *Microbacterium* sp. Strain Alg239_V18, an *Actinobacterium* Retrieved from the Marine Sponge *Spongia* sp.', *Genome announcements*. American Society for Microbiology (ASM), 5(3). doi: 10.1128/genomeA.01457-16.

Kester, D. *et al.* (1967) 'Preparation of artificial seawater', *Limnol Ocea*, 12, pp. 176–179.

Kiuru, P. *et al.* (2014) 'Exploring Marine Resources for Bioactive Compounds', *Planta Medica*, 80(14), pp. 1234–1246. doi: 10.1055/s-0034-1383001.

Kogure, Y. *et al.* (2014) 'Catheter-related septic shock by *Micrococcus* in an autologous hematopoietic stem cell transplantation recipient.', *American journal of infection control*. Elsevier, 42(1), p. 87. doi: 10.1016/j.ajic.2013.07.010.

Koufakis, T. *et al.* (2015) 'Case Report Pneumonia by *Listeria monocytogenes*: A Common Infection by an Uncommon Pathogen'. doi: 10.1155/2015/627073.

Lam, K. S. (2006) 'Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes', *Current Opinion in Microbiology*. doi: 10.1016/j.mib.2006.03.004.

Lamilla, C. *et al.* (2018) 'Streptomyces luridus So3.2 from Antarctic soil as a novel producer of compounds with bioemulsification potential', *PLOS ONE*. Edited by A. Franzetti. Public Library of Science, 13(4), p. e0196054. doi: 10.1371/journal.pone.0196054.

Leiva P, S. *et al.* (2004) 'Actividad antimicrobiana de actinomycetes aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile', *Revista Medica de Chile*, 132(2), pp. 151–159. doi: 10.4067/S0034-98872004000200003.

Leiva, S. *et al.* (2015) 'Diversity of pigmented Gram-positive bacteria associated with marine macroalgae from Antarctica', *FEMS Microbiology Letters*. Edited by A. Klier, 362(24), p. fnv206. doi: 10.1093/femsle/fnv206.

de León, L. *et al.* (2011) '*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* , a Seedborne Tomato Pathogen: Healthy Seeds Are Still the Goal', *Plant Disease*, 95(11), pp. 1328–1338. doi: 10.1094/PDIS-02-11-0091.

- Levy, S. B. and Marshall, B. (2004) 'Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses', *Nature Medicine*, 10(12s), pp. S122–S129. doi: 10.1038/nm1145.
- Lewin, G. R. *et al.* (2016) 'Evolution and Ecology of *Actinobacteria* and Their Bioenergy Applications', *Annual Review of Microbiology*, 70(1), pp. 235–254. doi: 10.1146/annurev-micro-102215-095748.
- Li, J. W.-H. and Vederas, J. C. (2009) 'Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier?', *Science*, 325(5937), pp. 161–165. doi: 10.1126/science.1168243.
- Lila, G. *et al.* (2017) 'The prevalence and resistance patterns of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital in Kosovo.', *Le infezioni in medicina : rivista periodica di eziologia, epidemiologia, diagnostica, clinica e terapia delle patologie infettive*, 25(1), pp. 21–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28353451>
- Ludwig, W. *et al.* (2012) 'Road map of the phylum Actinobacteria', in *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. New York, NY: Springer New York, pp. 1–28. doi: 10.1007/978-0-387-68233-4_1.
- Luzhetskyy, A., Pelzer, S. and Bechthold, A. (2007) 'The future of natural products as a source of new antibiotics.', *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)*, 8(8), pp. 608–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17668363>
- Maldonado, L. A. *et al.* (2005) 'Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments', *Antonie van Leeuwenhoek*, 87(1), pp. 11–18. doi: 10.1007/s10482-004-6525-0.
- Mandal, P. (2017) 'An insight of environmental contamination of arsenic on animal health', *Emerging Contaminants*. Elsevier, 3(1), pp. 17–22. doi: 10.1016/J.EMCON.2017.01.004.
- Manivasagan, P. *et al.* (2014) 'Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria', *Microbiological Research*. Urban & Fischer, 169(4), pp. 262–278. doi: 10.1016/J.MICRES.2013.07.014.
- Maraolo, A. E. *et al.* (2017) 'Management of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit: state of the art', *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 15(9), pp. 861–871. doi: 10.1080/14787210.2017.1367666.

- Martins, A. *et al.* (2014) 'Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: tips for success.', *Marine drugs*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 12(2), pp. 1066–101. doi: 10.3390/md12021066.
- Medina, E. and Pieper, D. H. (2016) 'Tackling threats and future problems of multidrug-resistant bacteria', *Current Topics in Microbiology and Immunology*. doi: 10.1007/82_2016_492.
- Mincer, T. J., Fenical, W. and Jensen, P. R. (2005) 'Culture-dependent and culture-independent diversity within the obligate marine actinomycete genus *Salinispora*.', *Applied and environmental microbiology*. American Society for Microbiology (ASM), 71(11), pp. 7019–28. doi: 10.1128/AEM.71.11.7019-7028.2005.
- Ministerios de Medio Ambiente, M. (2014) *QUINTO INFORME NACIONAL DE BIODIVERSIDAD DE CHILE*. Available at: http://portal.mma.gob.cl/wp-content/uploads/2017/08/Libro_Convenio_sobre_diversidad_Biologica.pdf
- Mora, C. *et al.* (2011) 'How Many Species Are There on Earth and in the Ocean?', *PLoS Biology*. Edited by G. M. Mace. Public Library of Science, 9(8), p. e1001127. doi: 10.1371/journal.pbio.1001127.
- Naik, G. *et al.* (2015) 'OPTIMIZATION OF CULTURE CONDITIONS OF STREPTOMYCES ZAOMYCETICUS RC 2073 BY SHAKE FLASK METHOD', *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical sciences*, 2(4), pp. 620–629.
- Nammalwar, P. (1983) *Heavy metals pollution in the marine environment*. Available at: http://eprints.cmfri.org.in/8321/1/SCIENCE_REPORTER_VOL_20%283%29_158-160.pdf
- Nandi, M. *et al.* (2018) '*Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* : bacterial canker of tomato, molecular interactions and disease management', *Molecular Plant Pathology*, 19(8), pp. 2036–2050. doi: 10.1111/mpp.12678.
- Newman, D. J. and Cragg, G. M. (2012) 'Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010', *Journal of Natural Products*, 75(3), pp. 311–335. doi: 10.1021/np200906s.
- Nithya, K. *et al.* (2018) 'Desert actinobacteria as a source of bioactive compounds production with a special emphases on Pyridine-2,5-diacetamide a new pyridine alkaloid produced by *Streptomyces* sp. DA3-7', *Microbiological Research*, 207, pp. 116–133. doi:

10.1016/j.micres.2017.11.012.

O'Neill, J. (2016) *TACKLING DRUG-RESISTANT INFECTIONS GLOBALLY: FINAL REPORT AND RECOMMENDATIONS THE REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE CHAIRED*.

Available at: https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final paper_with cover.pdf

OECD Environmental Performance Reviews: Chile 2016 (2016). OECD Publishing (OECD Environmental Performance Reviews). doi: 10.1787/9789264252615-en.

Ojuederie, O. and Babalola, O. (2017) 'Microbial and Plant-Assisted Bioremediation of Heavy Metal Polluted Environments: A Review', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(12), p. 1504. doi: 10.3390/ijerph14121504.

Okoro, C. K. *et al.* (2009) 'Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile', *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 95(2), pp. 121–133. doi: 10.1007/s10482-008-9295-2.

Palacio Bielsa, A. (2010) *El Chancro Bacteriano del tomate: Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*. Available at:

http://www.aragon.es/estaticos/ImportFiles/12/docs/Areas/Sanidad_Vegetal/Proteccion_Vegetal/Publicaciones/Informaciones_Tecnicas/HOJAS_INFORMATIVAS_CHANCRO_BACTERIANO_TOMATE_2010.pdf

Palomo, S. *et al.* (2013) 'Sponge-derived Kocuria and Micrococcus spp. as sources of the new thiazolyl peptide antibiotic kocurin.', *Marine drugs*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 11(4), pp. 1071–86. doi: 10.3390/md11041071.

Parra, S. *et al.* (2015) 'Distribution and pollution assessment of trace elements in marine sediments in the Quintero Bay (Chile)', *Marine Pollution Bulletin*. Pergamon, 99(1–2), pp. 256–263. doi: 10.1016/J.MARPOLBUL.2015.07.066.

Patin, N. V. *et al.* (2017) 'Effects of Actinomycete Secondary Metabolites on Sediment Microbial Communities', *Applied and Environmental Microbiology*. Edited by J. E. Kostka, 83(4). doi: 10.1128/AEM.02676-16.

Polkade, A. V *et al.* (2016) 'Quorum Sensing: An Under-Explored Phenomenon in the Phylum Actinobacteria.', *Frontiers in microbiology*. Frontiers Media SA, 7, p. 131. doi: 10.3389/fmicb.2016.00131.

- Poolman, J. T. and Wacker, M. (2016) 'Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* , a Common Human Pathogen: Challenges for Vaccine Development and Progress in the Field', *Journal of Infectious Diseases*, 213(1), pp. 6–13. doi: 10.1093/infdis/jiv429.
- Portnoy, D. A., Auerbuch, V. and Glomski, I. J. (2002) 'The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection', *The Journal of Cell Biology*, 158(3), pp. 409–414. doi: 10.1083/jcb.200205009.
- Prestinaci, F., Pezzotti, P. and Pantosti, A. (2015) 'Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon', *Pathogens and Global Health*, 109(7), pp. 309–318. doi: 10.1179/2047773215Y.0000000030.
- Rainbow, P. S. and Luoma, S. N. (2011) 'Metal toxicity, uptake and bioaccumulation in aquatic invertebrates—Modelling zinc in crustaceans', *Aquatic Toxicology*, 105(3–4), pp. 455–465. doi: 10.1016/j.aquatox.2011.08.001.
- Rojas, C. (2016) *Estudio de Actinobacterias marinas provenientes de Isla de Pascua como agentes productores de compuestos bioactivos y evaluación de si potencial en biodegradación de micro-plásticos.*
- Romano, K. A. *et al.* (2017) 'Metabolic, Epigenetic, and Transgenerational Effects of Gut Bacterial Choline Consumption', *Cell Host & Microbe*, 22(3), p. 279–290.e7. doi: 10.1016/j.chom.2017.07.021.
- Saga, T. and Yamaguchi, K. (2009) *History of Antimicrobial Agents and Resistant Bacteria*, *JMAJ*. Available at: http://www.med.or.jp/english/pdf/2009_02/103_108.pdf
- Sambrook, J. and Russell, D. (2001) 'Molecular cloning: a laboratory manual', *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, p. 626.
- Santibáñez, F., Roa, P. and Santibáñez, P. (2008) 'Biodiversidad de Chile Patrimonio y desafíos'. Available at: <http://www.uss.cl/biblioteca/wp-content/uploads/2016/09/Biodiversidad-de-Chile.-Patrimonio-y-desafíos-CONAMA.pdf>
- Sengupta, S., Chattopadhyay, M. K. and Grossart, H.-P. (2013) 'The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature', *Frontiers in Microbiology*, 4, p. 47. doi: 10.3389/fmicb.2013.00047.

- Shaaban, K. A. *et al.* (2011) 'Landomycins P–W, Cytotoxic Angucyclines from *Streptomyces cyanogenus* S-136', *Journal of Natural Products*, 74(1), pp. 2–11. doi: 10.1021/np100469y.
- Sharma, P. *et al.* (2012) 'Groundwater Contaminated with Hexavalent Chromium [Cr (VI)]: A Health Survey and Clinical Examination of Community Inhabitants (Kanpur, India)', *PLoS ONE*. Edited by J. E. Mendelson. Public Library of Science, 7(10), p. e47877. doi: 10.1371/journal.pone.0047877.
- Shen, B. (2015) 'A New Golden Age of Natural Products Drug Discovery', *Cell*, 163(6), pp. 1297–1300. doi: 10.1016/j.cell.2015.11.031.
- Shirling, E. and Gottlieb, D. (1966) 'Methods for characterization of *Streptomyces* species', *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16(3), pp. 313–340.
- Solanki, R., Khanna, M. and Lal, R. (2008) *Bioactive compounds from marine actinomycetes*, *Indian J. Microbiol.* Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3476783/pdf/12088_2008_Article_52.pdf (Accessed: 7 October 2018).
- Solomon, F. (2009) *Impacts of Copper on Aquatic Ecosystems and Human Health*. Available at: http://www.ushydrotech.com/files/6714/1409/9604/Impacts_of_Copper_on_Aquatic_Ecosystems_and_human_Health.pdf (Accessed: 8 October 2018).
- Tancos, M. A. *et al.* (2013) 'Tomato fruit and seed colonization by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* through external and internal routes.', *Applied and environmental microbiology*. American Society for Microbiology, 79(22), pp. 6948–57. doi: 10.1128/AEM.02495-13.
- Tchounwou, P. B. *et al.* (2012) 'Heavy metal toxicity and the environment.', *EXS*. NIH Public Access, 101, pp. 133–64. doi: 10.1007/978-3-7643-8340-4_6.
- Tiwari, K. and Gupta, R. K. (2012) 'Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics', *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(2), pp. 108–132. doi: 10.3109/07388551.2011.562482.
- Tong, S. Y. C. *et al.* (2015) 'Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management', *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), pp. 603–661. doi: 10.1128/CMR.00134-14.

- Uchil, R. R. *et al.* (2014) 'Strategies to combat antimicrobial resistance.', *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. JCDR Research & Publications Private Limited, 8(7), pp. ME01-4. doi: 10.7860/JCDR/2014/8925.4529.
- Undabarrena, A., Beltrametti, F., Claverías, F. P., *et al.* (2016) 'Exploring the diversity and antimicrobial potential of marine actinobacteria from the comau fjord in Northern Patagonia, Chile', *Frontiers in Microbiology*. doi: 10.3389/fmicb.2016.01135.
- Undabarrena, A., Beltrametti, F., Claverías, F. P., *et al.* (2016) 'Exploring the Diversity and Antimicrobial Potential of Marine Actinobacteria from the Comau Fjord in Northern Patagonia , Chile', 7(July), pp. 1–16. doi: 10.3389/fmicb.2016.01135.
- Undabarrena, A. *et al.* (2017) '-Genomic data mining of the marine actinobacteria *Streptomyces* sp. H-KF8 unveils insights into multi-stress related genes and metabolic pathways involved in antimicrobial synthesis', *PeerJ*. PeerJ Inc., 5, p. e2912. doi: 10.7717/peerj.2912.
- Usha Kiranmayi, M. *et al.* (2011) 'Optimization of Culturing Conditions for Improved Production of Bioactive Metabolites by *Pseudonocardia* sp. VUK-10.', *Mycobiology*. Korean Society of Mycology, 39(3), pp. 174–81. doi: 10.5941/MYCO.2011.39.3.174.
- Ventola, C. L. (2015) 'The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats.', *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*. MediMedia, USA, 40(4), pp. 277–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25859123>
- Ventura, M. *et al.* (2007) 'Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum.', *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. American Society for Microbiology (ASM), 71(3), pp. 495–548. doi: 10.1128/MMBR.00005-07.
- Vézina, C., Kudelski, A. and Sehgal, S. N. (1975) 'Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle.', *The Journal of Antibiotics*, 28(10), pp. 721–726. doi: 10.7164/antibiotics.28.721.
- Wang, S.-L. *et al.* (2013) 'Heavy metal pollution in coastal areas of South China: A review', *Marine Pollution Bulletin*, 76(1–2), pp. 7–15. doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.08.025.
- Winner, C. (2010) 'How Does Toxic Mercury Get into Fish?', in *Oceanus*. [Woods Hole Oceanographic Institution]. Available at: <https://www.whoi.edu/oceanus/feature/how-does-toxic-mercury-get-into-fish>

- Wohlleben, W. *et al.* (2016) 'Antibiotic drug discovery', *Microbial Biotechnology*. Wiley/Blackwell (10.1111), 9(5), pp. 541–548. doi: 10.1111/1751-7915.12388.
- World Health Organization, W. H. O. (2014) *ANTIMICROBIAL RESISTANCE Global Report on Surveillance*. Available at:
http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf;jsessionid=DE2CFEC2BB885FC127BBB1C29B6CD0D5?sequence=1
- Wuana, R. A. and Okieimen, F. E. (2011) 'Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation', *ISRN Ecology*. Hindawi, 2011, pp. 1–20. doi: 10.5402/2011/402647.
- Yang, S. *et al.* (2001) 'Micrococcus luteus teichuronic acids activate human and murine monocytic cells in a CD14- and toll-like receptor 4-dependent manner.', *Infection and immunity*. American Society for Microbiology Journals, 69(4), pp. 2025–30. doi: 10.1128/IAI.69.4.2025-2030.2001.
- Zgurskaya, H. I., López, C. A. and Gnanakaran, S. (2015) 'Permeability Barrier of Gram-Negative Cell Envelopes and Approaches To Bypass It', *ACS Infectious Diseases*. American Chemical Society, 1(11), pp. 512–522. doi: 10.1021/acsinfecdis.5b00097.
- Zhang, H. Z., Schmidt, H. and Piepersberg, W. (1992) 'Molecular cloning and characterization of two lincomycin-resistance genes, *lmrA* and *lmrB*, from *Streptomyces lincolnensis* 78-11.', *Molecular microbiology*, 6(15), pp. 2147–57. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1328813>
- Zhang, Y. *et al.* (2014) 'Six centuries of changing oceanic mercury', *Global Biogeochemical Cycles*. Wiley-Blackwell, 28(11), pp. 1251–1261. doi: 10.1002/2014GB004939.
- Zinger, L. *et al.* (2011) 'Global Patterns of Bacterial Beta-Diversity in Seafloor and Seawater Ecosystems', *PLoS ONE*. Edited by J. A. Gilbert. Public Library of Science, 6(9), p. e24570. doi: 10.1371/journal.pone.0024570.

8 Anexos

Anexo A Soluciones y medios de cultivo

Todos los medios y soluciones fueron esterilizados en autoclave a 121°C y 1 atmósfera de presión durante 60 minutos.

1. Agua de Mar Artificial (*Artificial Sea Water*, ASW) (Kester *et al.*, 1967)

Para 1 litro de agua Milli-Q

Tabla 8-1 Composición agua de mar artificial (ASW)

Compuesto	Cantidad [g]	Compuesto	Cantidad [g]
NaCl	23,47	KBr	0,096
NaSO ₄	3,92	H ₂ BO ₃	0,026
MgCl ₂ ·6H ₂ O	10,64	SrCl ₂ ·6H ₂ O	0,0404
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,457	NaF	0,003
NaHCO ₃	0,192	KCl	0,664

2. Tryptic Soy Agar (TSA, Difco) – Tryptic Soy Broth^a (TSB, Difco)

Para 1 litro de agua Milli-Q

Tabla 8-2 Composición TSA

Compuesto	Cantidad [g]	Compuesto	Cantidad [g]
Digerido pancreático de caseína	15	Cloruro de sodio	5
Digerido papaínico de soja	5	Agar	15

^a: Tryptic Soy Broth se diferencia en que no utiliza Agar.

3. Medio LB (Sambrook and Russell, 2001)

Para 1 litro de agua Milli-Q

Tabla 8-3 Composición medio LB

Compuesto	Cantidad [g]	Compuesto	Cantidad [g]
Triptona	10	Cloruro de sodio	10
Extracto de levadura	5	Agar	18

4. Medio ISP-1/ASW (Shirling and Gottlieb, 1966)

Para 1 litro de ASW

Tabla 8-4 Composición medio ISP-1/ASW

Compuesto	Cantidad [g]
Triptona	5
Extracto de levadura	3
Agar	18

5. Medio ISP-2/ASW (Shirling and Gottlieb, 1966)

Para 1 litro de ASW

Tabla 8-5 Composición medio ISP-2/ASW

Compuesto	Cantidad [g]	Compuesto	Cantidad [g]
Extracto de malta	10	Dextrosa	4
Extracto de levadura	4	Agar	18

6. Medio SG (Modificado) (Shaaban *et al.*, 2011)

Para 1 litro de agua Milli Q

Tabla 8-6 Composición medio SG

Compuesto	Cantidad [g]	Compuesto	Cantidad [g]
Harina de Soya	10	CoCl ₂ 6H ₂ O	0,001
Extracto de levadura	5	Carbonato de Calcio	2

7. Medio SM19 (Zhang *et al.*, 1992)

Para 1 litro de agua Milli Q

Tabla 8-7 Composición medio SM19

Compuesto	Cantidad [g]
Pasta de Tomate	40
Avena	10
Glucosa	2

8. Medio R5A (Fernández *et al.*, 1998)

Para 1 litro de agua Milli Q

Tabla 8-8 Composición medio R5A^b

Compuesto	Cantidad [g]	Compuesto	Cantidad [g]
Sacarosa	103	Extracto de levadura	5
K ₂ SO ₄	0,25	MOPS	21
MgCl ₂ 6H ₂ O	10,12	Agar	22
Glucosa	10	Casaminoácidos	0,1

^b: Para completar el medio se debe agregar 2 [ml] de oligoelementos por litro de Medio y ajustar el pH en 6,85.

9. Medio Mínimo MM/ASW (Hamedi *et al.*, 2015)

Para 1 litro de agua ASW

Tabla 8-9 Composición Medio Mínimo

Compuesto	Cantidad [g]	Compuesto	Cantidad [g]
L-asparagine	0,5	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,01
K ₂ HPO ₄	0,5	Glucosa	10
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2	Agar	18

Anexo B Equipos

Tabla 8-10 Equipos

Equipo	Marca
Autoclave	Huxle HL-341
Incubadora	Memmert (Modell 100-800)
Agitador magnético	Thermo scientific
Termociclador	Bio-rad
Centrífuga	Thermo scientific
Rotavapor	DLAB (Re100-Pro)
Espectrofotómetro	Hewlett Packard
Speedvac	Arquimed S.A. (Concentrator 5301)

Anexo C Proyectos

Adjudicación proyecto: “*Actinobacterias marinas no miceliares provenientes de Valparaíso: Evaluación de la actividad antibacteriana y exploración de su potencial ambiental*”. Programa de Iniciativas Estudiantiles y Académicas (PIE>A), Universidad Técnica Federico Santa María.

Anexo D Nomenclatura

1. Nomenclatura Cepas

Tabla 8-11 Resumen Cepas utilizadas

Cepa	Género	Lugar de procedencia
H-KB5	<i>Kocuria</i> sp.	Fiordo de Comau
H-JH3	<i>Arthrobacter</i> sp.	Fiordo de Comau
IpEH-1	<i>Brachybacterium</i> sp.	Isla de Pascua
H-BE7	<i>Brevibacterium</i> sp.	Fiordo de Comau
Vc820	<i>Brevibacterium</i> sp.	Valparaíso
VO30-3	<i>Arthrobacter</i> sp.	Valparaíso
VP2-3	<i>Microbacterium</i> sp.	Valparaíso
VO40-3	<i>Aeromicrobium</i> sp.	Valparaíso
H-ED12	<i>Curtobacterium</i> sp.	Fiordo de Comau

1. Nomenclatura Patógenas

Tabla 8-12 Cepas Modelo de Patógenas utilizadas

Cepa	Patógena
PSAU	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
STAU	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAEN	<i>Salmonella enterica</i>
LIMO	<i>Listeria monocytogenes</i>
CLMI	<i>Clavibacter michiganensis</i>
ESCO	<i>Escherichia coli</i>
MILU	<i>Micrococcus luteus</i>