



Actividad antibacteriana de actinomicetos frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* multirresistentes de origen hospitalario

Antibacterial activity of actinomyces against multiresistant *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a hospital

Luis Alberto Ortega-Bastidas¹ orcid.org/0000-0001-8339-7557

Roger David Castillo-Arteaga² orcid.org/0000-0002-0724-3959

Jenny Dimelza Gómez-Arrieta^{1*} orcid.org/0000-0001-9994-3030

Pablo Fernández-Izquierdo¹ orcid.org/0000-0003-0158-8398

Edith Mariela Burbano-Rosero³ orcid.org/0000-0002-4021-2660

1. Grupo de Investigación Biotecnología Microbiana. Universidad de Nariño. Pasto, Colombia
2. Instituto de Farmacología, Departamento de Biología Farmacéutica, Universidad de Tübingen, Alemania
3. Grupo de Investigación en Biología Matemática y Matemática Aplicada (GIBIMMA). Universidad de Nariño. Pasto, Colombia

Fecha de recepción: Junio 21 - 2021

Fecha de revisión: Agosto 06 - 2021

Fecha de aceptación: Diciembre 20 - 2021

Ortega-Bastidas LA, Castillo-Arteaga RD, Gómez-Arrieta JD, Fernández-Izquierdo P, Burbano-Rosero EM. Actividad antibacteriana de actinomicetos frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* multirresistentes de origen hospitalario. *Univ. Salud.* 2022;24(1):85-94. DOI: <https://doi.org/10.22267/rus.222401.257>

Resumen

Introducción: La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es un problema de salud pública que manifiesta la disminuida eficacia de estos agentes en la prevención y tratamiento de una proporción cada vez más amplia de patologías. Los actinomicetos son un grupo bacteriano importante de productores de metabolitos activos contra patógenos. **Objetivo:** Aislar actinomicetos del bosque tropical de Nariño, con potencial producción de metabolitos inhibitorios contra bacterias multidrogo-resistentes. **Materiales y métodos:** Se tomaron muestras de suelo de Bosque Tropical Húmedo de la Reserva Natural del Río Nambí, se analizaron microbiológica y molecularmente. Se estimuló la producción *in vitro* de metabolitos secundarios y evaluó el efecto inhibitorio de estos extractos contra las bacterias multidrogo-resistentes *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. **Resultados:** Se obtuvieron 11 aislados presuntivos, se confirmó que cuatro de ellos correspondieron al género *Streptomyces sp.* Las pruebas de inhibición contra bacterias multidrogo-resistentes *E. coli* y *S. aureus*, permitieron verificar que el aislado P3772 fue el más eficiente en la inhibición de los patógenos. **Conclusiones:** Todos los actinomicetos evaluados presentan actividad antibacteriana contra al menos una de las bacterias patógenas estudiadas; destacando el aislado P3772, que inhibe a *E. coli* y *S. aureus*. Se espera caracterizar los compuestos vinculados a la actividad antibacteriana.

Palabras clave: Antibacterianos; farmacorresistencia bacteriana; Actinomycetales. (Fuente: DeCS, Bireme).

Abstract

Introduction: Antimicrobial resistance (AR) is a public health problem that reveals the diminished efficacy of these agents in the prevention and treatment of an increasingly larger number of pathologies. Actinomycetes are an important bacterial producer group of metabolites that are active against pathogens. **Objective:** To isolate actinomycetes from the tropical forest of Nariño (Colombia), which have the potential to produce inhibitory metabolites against multi-drug resistant bacteria. **Materials and methods:** Soil samples were taken from the Humid Tropical Forest of the Río Nambí Natural Reserve and analyzed through microbiological and molecular assays. *In vitro* production of secondary metabolites was first stimulated, followed by the assessment of the inhibitory effect of these extracts against multi-drug resistant *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Results:** 11 presumptive isolates were obtained, confirming that four of them corresponded to the *Streptomyces sp.* genus. The bacterial isolate P3772 was identified as the one with the highest inhibitory effect against multi-drug resistant *E. coli* and *S. aureus*. **Conclusions:** All the actinomycetes evaluated presented antibacterial activity. The isolate P3772 stands out, which inhibited both *E. coli* and *S. aureus*. The compounds associated with this antibacterial activity will be characterized in future studies.

Keywords: Anti-bacterial agents; drug resistance, bacterial; Actinomycetales. (Source: DeCS, Bireme).

*Autor de correspondencia
Jenny Dimelza Gómez Arrieta
e-mail: rizaldza@gmail.com

Introducción

La resistencia bacteriana es considerada una problemática de salud pública mundial que genera altas tasas de mortalidad. Aunque es de grandes proporciones, es posible minimizar su impacto, impulsando la búsqueda de nuevos productos como compuestos de origen metabólico y genes que puedan ser usados como antimicrobianos, cuyas fuentes sean producto de la biodiversidad natural de los ecosistemas, en este caso de la región nariñense⁽¹⁾. Las principales causas de resistencia bacteriana se vinculan al uso de antibióticos en las fuentes primarias de alimentación humana⁽²⁾, en el entorno clínico y en la industria, ocasionando mecanismos que aumentan la probabilidad de generación de resistencia, multi-resistencia, resistencia-extrema y pan-resistencia⁽³⁾. Adicionalmente, la movilización humana facilita la diseminación de genes, la adaptación bacteriana a diferentes ambientes⁽⁴⁾ y finalmente, a los procesos ecológico-evolutivos que brindan mecanismos para la incorporación de material genético como plásmidos, transposones, integrones, entre otros, que conllevan al aumento de resistencia⁽¹⁾. Complementariamente, las variaciones ambientales establecen condiciones ideales de distribución ilimitada de dichos genes, contribuyendo a la tolerancia a los antimicrobianos presentes en bacterias ambientales⁽⁵⁾.

En Colombia, la incidencia de infecciones bacterianas es elevada, cerca de 40% de los casos se dan en mujeres y 12% en hombres. Los antecedentes indican que el patógeno *Escherichia coli*, es responsable de 70% a 95% de las infecciones de origen bacteriano, y *Staphylococcus aureus* del 35%⁽⁶⁾.

El desarrollo de resistencia en estas bacterias ha resultado en la ineficacia de antibióticos de primera y segunda generación, por lo cual la tendencia es la búsqueda de microorganismos en zonas sin exploración humana con el fin de encontrar nuevas fuentes de antibióticos⁽⁷⁾. El aislamiento de microorganismos a partir de ambientes sin intervención humana ha permitido caracterizar diversas especies productoras de potenciales metabolitos antibacterianos, ejemplo de ello lo constituyen los actinomicetos^(8,9), bacilos Gram positivos formadores de cadenas micelares ubicados en gran variedad de ecosistemas, con pH bajo de suelo, disposición alta de materia orgánica⁽⁹⁾.

Los actinomicetos son un grupo catalogado como uno de los más prometedores para la obtención de fuentes de antimicrobianos, ya que actualmente producen entre 60% y 70% de los antibióticos del mercado farmacológico⁽⁸⁾. Dentro de los metabolitos (MS) con actividad antibiótica sintetizados por *Streptomyces* sp, se destaca un grupo de compuestos denominados policétidos y péptidos de síntesis no ribosomal, entre los cuales se encuentran sustancias de aplicación en medicina y biotecnología⁽⁸⁾. Estas bacterias requieren de condiciones específicas como cantidad de materia orgánica, pH, disponibilidad de sustratos en el suelo, que de acuerdo con lo descrito en la literatura⁽¹⁰⁾, presentaría características semejantes al ecosistema nariñense de la Reserva Nambí^(11,12).

Teniendo como base la problemática de la Resistencia Antimicrobiana (RAM), este estudio se propuso aislar actinomicetos del bosque tropical de Nariño, con potencial producción de metabolitos inhibitorios contra bacterias multidrogo-resistentes. Para eso, se trabajó con actinomicetos que, de acuerdo con lo previamente descrito, son las principales bacterias productoras de agentes antibacterianos, se encuentran en ecosistemas poco explorados, y para su crecimiento, requieren de características biológicas y fisicoquímicas como las presentes en el bosque tropical de Nariño.

Materiales y métodos

Lugar de muestreo, colecta, transporte y tratamiento de suelo

Para el aislamiento de actinomicetos, se tomaron muestras de suelo de la reserva Natural Rio Nambí, perteneciente al departamento de Nariño, Colombia; compuesta por un área aproximada de 1500 ha, formada por bosque pluvial premontano, ubicada a una altura entre 1100 y 1900 m.s.n.m. Esta se caracteriza por presentar altos índices de humedad como resultado de una precipitación media anual cercana a 8000 mm y temperatura promedio de 19 °C⁽¹¹⁾. Se recolectaron de 5-10 g de muestras de suelo con una perforación en "V", a una profundidad entre 2-8 cm^(9,13) tal como se presenta en la Tabla 1. El suelo presentó capas de hojarasca de aproximadamente 20 mm, ausencia de inclinación, tránsito o retención de cuerpos de agua, consecutivamente las alícuotas de suelo se almacenaron y transportaron bajo refrigeración a 4°C al laboratorio de Procesos Microbianos de la Universidad de Nariño para su respectivo procesamiento.

Tabla 1. Ubicación de los puntos de muestreo y altura de cada uno

Punto de muestreo	Coordenadas	Altura
P1	N 01°, 17.1' 29", W 0.78°, 0.41' 470"	1400 m.s.n.m
P2	N 01°, 17', 62", W 78°, 4', 453"	1444 m.s.n.m
P3	N 01°, 17', 117", W 78°, 4', 419"	1428 m.s.n.m

Componentes fisicoquímicos del suelo

La determinación de los componentes fisicoquímicos del suelo fue realizada *in situ* usando el equipo *WTW Multi 3430*⁽¹⁴⁾. Los parámetros determinados fueron, pH, temperatura, luminosidad y humedad del suelo. Además, se realizaron análisis químicos de intercambio catiónico, materia orgánica, P, Ca, Mg, K, Al, Fe, Mn, Cu, Zn, B, N, C, S y densidad aparente⁽¹⁴⁾.

Aislamiento y caracterización morfológica, macroscópica y microscópica, y crecimiento de las actinobacterias

De cada muestra procesada^(9,15), se realizó siembra masiva por triplicado en los medios de cultivo: agar de aislamiento de actinomicetos, agar almidón amoniacal, agar sacarosa almidón y agar almidón caseína, cada uno con adición de Nistatina (20 µg/mL) como antifúngico, se incubaron a 30 °C por de 30 días, en incubadora marca *Binder GmbH Bergstr 14 D-78532 Tuttlingen*.

Una vez se verificó el crecimiento inicial de los actinomicetos, se observó macroscópicamente la presencia de micelio vegetativo, micelio aéreo, esporas, margen del aislado y elevación, además de la coloración del micelio, presencia de esporas y de exudados. Posteriormente, se realizó tinción de Gram para observar al microscopio (*AmScope*) a 100 X, presencia de células filamentosas Gram positivas formadoras de cadenas micelares⁽¹⁶⁾. Los aislados obtenidos fueron codificados con referencia al punto de muestreo (P1, P2, P3), la dilución madre (-3, -5, -7) y el número en secuencia en que fue aislado.

Para las bacterias que se identificaron posteriormente como *Streptomyces* sp, se realizó curva de crecimiento microbiano.

Identificación molecular

La extracción de DNA en los aislados se realizó por el método *Salting Out*^(17,18). La concentración final de DNA se determinó espectrofotométricamente usando

el *Nanodrop Thermo scientific*, modelo *Nanodrop One C*. Finalmente, todas las muestras se ajustaron a la misma concentración para la amplificación del gen 16S RNAr. Para ello, se utilizaron los cebadores universales 27F [5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'] y 1041R [5'CGGTGTGTACAAGACCC 3']. La PCR se realizó en el equipo MULTIGENE OPTIMAX, *Labnet International, Inc*. Para eso, se preparó una mezcla que contenía Agua MilliQ, *Buffer Colorless 5X* (Promega), MgCl₂ (Promega), de dNTP, cebadores (27F y 1041R), ADN polimerasa GoTaq R (Promega) y DNA. Para la reacción, se aplicaron los siguientes ciclos: inicio 2 min a 95 °C para desnaturalización inicial, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 2 min, 55 °C por 1 min y 72 °C por 3 min, con una elongación final a 72 °C por 10 min. Los fragmentos de ADN amplificados por PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa a 1% usando como intercalante gel red (Biotium).

Los amplicones fueron secuenciados por la Empresa Corpogen mediante el contrato 064S-B-2019-SEC. Las secuencias obtenidas se editaron utilizando el programa *ClustalW* y *BLAST*. Para la secuencia parcial del gen 16S rRNA se alinearon con secuencias de nucleótidos almacenadas en las bases de datos GenBank/Ribosomal Database Project/NCBI.

Producción y extracción de metabolitos secundarios

Las esporas de los aislados fueron reactivadas a 30 °C durante 3 días en 10 mL de caldo tripticasa soja (TS), posteriormente 2 ml de este medio fueron inoculados en 200 mL de medio (R5) para aislamiento de actinomicetos Himedia Ref M490 (Proteína M-Sales de caseinato de sodio 2 g/L; L-Asparagina 0,1 g/L; Propionato de sodio 4 g/L; fosfato de hidrógeno dipotásico 0,5 g/L; sulfato de magnesio 0,1 g/L; sulfato ferroso 0,001 g/L; Agar 15 g/L; pH final de 8,1 a 25 °C± 0,2) recomendado como medio de estrés^(5,18). Se inocularon 2 ml de estos, en 200 mL de medio R5⁽¹⁸⁾ e incubaron a 30 °C /180 rpm por 10 días. A partir de los siete días se detectó cambio de color en el medio de cultivo de los diferentes aislados⁽¹⁸⁾, indicando el agotamiento del sustrato principal y activación del metabolismo secundario⁽¹⁸⁾.

Terminada la incubación, al medio R5 se le adicionaron 100 mL de Acetato de etilo. La precipitación con acetato de etilo o mezclas con este, es un protocolo común en la obtención de compuestos con actividad antimicrobiana^(5,18), se agitó por dos horas a 180 rpm y por 1 h a 90 rpm; y finalmente se

llevó a separación en embudo de decantación a temperatura ambiente. Se tomó la fase orgánica y se secó por rota- evaporación hasta obtener la menor cantidad posible de solución (Equipo *Heidolph Rotary Evaporator Hei VAP*)⁽¹⁷⁾.

Perfil de resistencia a antibióticos de las bacterias patógenas

Se determinó mediante la técnica de *Bauer Kirby* el perfil de resistencia de las bacterias patógenas *E. coli* y *S. aureus* aisladas de muestras hospitalarias y conservadas en el Banco de Células Primarias del Laboratorio de Procesos Microbianos de la Universidad de Nariño se determinó mediante la técnica de *Bauer Kirby*^(19,20). Los antibióticos usados fueron: (P) penicilina, (SAM) ampicilina (10µg), (AMC) amoxicilina (30µg), (CTX) cefotaxima (30µg), (STX) trimetoprim-sulfametoxazol (25µg), (CN) gentamicina (10µg), (ATM) aztreonam, (CIP) ciprofloxacina (5µg), (IPM) imipenem, (AK) amikacina (30µg), (S) estreptomycin (10µg) y (EM) eritromicina (30µg) (OXOID).

Pruebas de inhibición de bacterias patógenas por los extractos metabólicos

Para la prueba de inhibición se trabajó con el método de doble capa en Agar *Mueller Hinton* (MH), con 6 mm de diámetro por pozo⁽²¹⁾. Inicialmente, se adicionó la primera capa de agar MH y se perforaron los pozos, posteriormente, se adicionaron en el medio de cultivo 20 µL del extracto metabólico obtenido de cada aislado en cada pozo. Para el control negativo se utilizó agua destilada estéril y para el control positivo AMC (30µg). Finalmente, se incorporó otra capa de agar MH blando con las bacterias patógenas *E. coli* y *S. aureus* en solución. Los resultados fueron positivos (+) cuando hubo presencia de halos, y negativos (-) en ausencia.

Para la prueba de inhibición por sensidiscos se trabajó con Agar MH y con sensidiscos de 5 mm de diámetro. Inicialmente, se realizó siembra masiva de las bacterias patógenas en medio de cultivo. Posteriormente, se adicionaron 20 µL de los respectivos extractos metabólicos a los sensidiscos, el control positivo (+) fue AK (30µg) y el negativo (-) agua destilada estéril. Los halos producidos por los metabolitos antibacterianos del extracto en las pruebas de pozos y sensidiscos fueron medidos con un Calibrador Pie de Rey en mm, el crecimiento intermedio fue reportado como bacteriostático

también fue medido. Se inoculó el solvente Acetato de etilo como control negativo⁽¹⁸⁾.

Concentración mínima inhibitoria (CMI)

De acuerdo con los datos de inhibición encontrados se observó que el extracto con mayor efecto antibacteriano fue el producido por el aislado P3772. Previamente se reactivaron las bacterias patógenas en tubos con caldo LB e incubaron a 37 °C hasta obtener un valor de turbidez de 0,5 en la escala *Mc Farland*. Para determinar la CMI de este extracto, en placas de microtitulación 12 x 8 se adicionaron 80 µL de caldo estéril MH, 10 µL del medio LB que contenía a las bacterias patógenas y 10 µL del extracto metabólico en porcentajes de 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, 0,39% y 0,19% para un volumen final de 200 µL. La columna 11 de la placa, sin adición del extracto metabólico se tomó control positivo y la columna 12 con AMC 30µg/ml, como control negativo. La placa preparada se incubó a 37 °C por 24 h. Transcurrido el tiempo, se agregaron 40 µL de Cloruro de trifetil-tetrazolium y se incubó por 12 h más. Las lecturas de inhibición se tomaron como negativas cuando el medio cambió a coloración roja (crecimiento bacteriano positivo) y como positivas cuando el medio no modificó su color (crecimiento bacteriano negativo), ya que la intensidad de la coloración rojiza es directamente proporcional a la actividad metabólica de los microorganismos. Los parámetros de evaluación definidos fueron Sensible (>5 pozos con inhibición), Intermedio (5 a 4 pozos con inhibición) y Resistente (<4 pozos con inhibición). Los resultados se procesaron en un *Heatmap* en *Microsoft Excel*, donde se realizó una matriz tomando 1 para sensible, 0,5 para intermedio y 0 para resistente.

Análisis del extracto metabólico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

El extracto metabólico con la mayor actividad inhibitoria (P3772) fue analizado por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en Columna Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 en el equipo *Prominence Shimadzu*. La fase móvil (A) fue H₂O+ 0,1% ácido fórmico y (B) fue acetonitrilo + 0,1% de ácido fórmico; en gradiente desde 5% a 100% de B por 20 min con un flujo de 1mL/min. Como control, se realizó una corrida utilizando el cloranfenicol, como patrón, debido al tiempo de retención en el que este fue eluido de la columna cromatográfica, de modo que se compararon los perfiles cromatográficos.

Prueba de citotoxicidad

Esta prueba fue realizada para evaluar los 4 aislados identificados molecularmente como *Streptomyces* sp. Para eso, se sembraron separadamente y por triplicado, en agar sangre a concentración de 3% y 5%, y se incubaron a 30 °C por 7 días. Terminado el tiempo de incubación, se registró la formación de lisis (alfa o beta) o la ausencia de lisis (gamma), se comprobó la presencia de hemólisis gamma⁽¹⁹⁾.

Consideraciones éticas

El trabajo fue avalado por el Comité de Ética de la Universidad de Nariño, en la sesión realizada el 19 de febrero de 2020, mediante el Acta de aprobación 001.

Resultados

Análisis fisicoquímico de suelos

Los resultados de los análisis fisicoquímicos realizados mostraron que el punto 1 de muestreo (P1) presentó los menores valores de pH, luminosidad y humedad, contrario a los datos obtenidos en el punto 3 (P3), cuyos valores fueron mayores (Tabla 2).

Tabla 2. Pruebas fisicoquímicas tomadas en campo y análisis fisicoquímico de las muestras de suelo

Parámetro	P1	P2	P3
pH	6,8	7,1	7,1
Luminosidad*	80	110	110
Humedad*	2	4	4,5
Muestras de suelo			
pH	4,43	4,36	4,45
Materia orgánica (%)	32	24,5	19,7
Fósforo (mg/Kg)	13,6	4,83	4,33
Intercambio catiónico (cmol/Kg)	71,7	59,1	49,3
Calcio (cmol/Kg)	7,66	0,24	0,08
Magnesio (cmol/Kg)	2,48	0,36	0,37
Potasio (cmol/Kg)	0,6	0,27	0,29
Aluminio (cmol/Kg)	2,15	4,86	2,68
Hierro (mg/Kg)	205	190	113
Manganeso (mg/Kg)	10,1	0,4	1,2
Cobre (mg/Kg)	0,47	0,93	0,84
Zinc (mg/Kg)	1,78	0,93	0,84
Boro (mg/Kg)	0,18	0,33	0,38
Nitrógeno (%)	0,78	0,71	0,63
Carbono (%)	18,6	14,2	11,4
Azufre (mg/Kg)	10,3	4,13	2,37
Densidad (g/cc)	0,55	0,4	0,7

*Los valores de Luminosidad tienen escala de 0 a 2000 y los valores de humedad escala de 0 a 10

** P1, Punto 1; P2, Punto 2; P3, Punto 3

La cuantificación de P, Mg, K, Cu y S en los tres puntos fue menor que la reportada previamente^(11,12) para componentes fisicoquímicos de suelo (Tabla 2). La composición de los macronutrientes P, Mg, K y S, fue inferior a la óptima para suelos⁽¹¹⁾.

El P3 presentó las cantidades más bajas de los elementos analizados en comparación con los otros puntos. Se presentaron bajos contenidos de P, Ca, Mg, Mn, Cu, Zn y S (Tabla 2, P3).

Aislamientos y crecimiento bacteriano

Se obtuvieron 11 aislados bacterianos, definidos por las características macro y microscópicas observadas. El agar de aislamientos de actinomicetos (AIA) suplementado con Nistatina fue seleccionado por presentar la mayor cantidad de colonias. Al realizar la tinción de Gram, y posteriormente observar al microscopio, se verificó que los 11 aislados obtenidos, presentaron las estructuras características de actinomicetos⁽²¹⁾. Las curvas de crecimiento construidas a partir de los aislados pertenecientes al género *Streptomyces* sp. se muestran en la (Figura 1).

Identificación molecular

Garantizada la integridad del ADN obtenido, se realizaron las ampliificaciones correspondientes al 16S rRNA de los actinomicetos, y se obtuvo el fragmento de 1500 pb esperado. Al realizar los análisis de secuencias y comparar las secuencias de la ampliificación del gen 16S rRNA respecto a las encontradas en el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), se determinó que 4 de los 11 aislados en estudio, correspondieron al género *Streptomyces* (Tabla 3).

En concordancia con los resultados obtenidos, los aislados P3772, P2761, P2758 y P2559 correspondieron al género *Streptomyces* sp.

Perfil de resistencia a antibióticos de las bacterias *E. coli* y *S. aureus*

Los perfiles de resistencia mostraron que *E. coli* fue resistente a P, CTX, SXT, ATM y CIP; sensible a SAM, CN, IPM, AK y sensibilidad intermedia a AMC. En cuanto a *S. aureus* mostró resistencia a ATM y sensibilidad a P, CTX, AK. Los demás antibióticos evaluados presentaron resultado indeterminado.

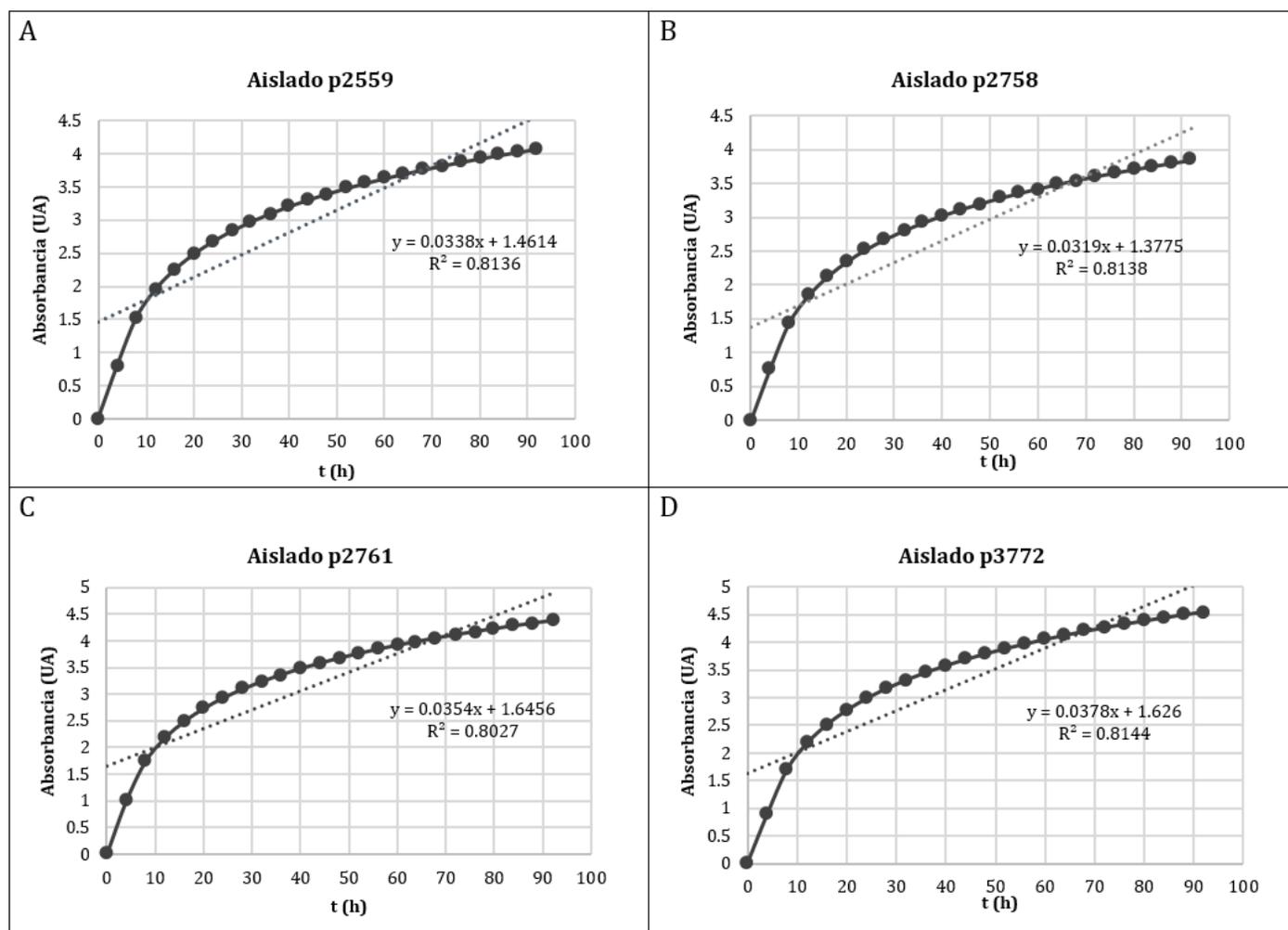


Figura 1. Curvas de crecimiento de los aislados. A). P2559; B). P2758; C). P2761 y D). P3772

Tabla 3. Identificación por medio del análisis de secuencias de los aislados de bacterias obtenidos

Aislado	Bacteria identificada	Cobertura (%)	Valor E	% Identidad	Código de acceso de la secuencia reportada en NCBI
P2566	<i>Bacillus haynesii</i>	99	0,0	91,34	MK467606.1
P3569	<i>Bacterium strainBS1487</i>	100	0,0	100	MK824675.1
P3772*	<i>Streptomyces</i> sp	99	0,0	100	KX950858.1
P2763	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100	0,0	99,39	MN240439.1
P3371	<i>Bacillus</i> sp	99	0,0	91,79	MK418568.1
P2761*	<i>Streptomyces</i> sp	100	0,0	99,8	KX950887.1
P2758*	<i>Streptomyces</i> sp	100	0,0	99,08	AB841059.1
P1718	<i>Bacillus</i> sp	100	0,0	100	MH368455.1
P3770	<i>Bacillus</i> sp	100	0,0	99,59	AB970661.1
P2360	<i>Bacillus</i> sp	100	0,0	89,45	MK415572.1
P2559*	<i>Streptomyces</i> sp	78	2e-123	77,61	MF769758.1

*Aislados correspondientes al género *Streptomyces* sp.

Pruebas de capacidad inhibitoria de los extractos metabólicos

Los resultados mostraron que el extracto P3772 presentó inhibición sobre *E. coli* y *S. aureus* en los dos métodos evaluados, por lo que se precisa como el más eficiente (Tabla 4). La generación de halos por el método de inhibición por sensibilización fue mayor por verse facilitada la difusión de los compuestos que están en el extracto. Con relación a demás extractos analizados, P2759 no presentó actividad, mientras que los extractos P2559 y P2761 mostraron actividad antibacteriana sólo frente a *E. coli*. La tabla 4, muestra el tamaño de los halos de inhibición, resultado de los ensayos realizados.

La ausencia de halos en el control (acetato de etilo) se observó en las dos metodologías aplicadas, comprobando que la actividad antibacteriana proviene de los extractos metabólicos evaluados (Tabla 4).

Tabla 4. Diámetro de los halos (mm) en las pruebas de inhibición

Aislado	<i>E. coli</i> (a)	<i>S. aureus</i> (a)	<i>E. coli</i> (b)	<i>S. aureus</i> (b)
P2758	0	9	0	0
P2559	0	0	2,55	0
P2761	0	0	8,5	0
P3772	10,1	15,66	9,76	15,33
Acetato de etilo*	0	0	0	0

*Control Acetato de etilo

(a) Inhibición por pozos; (b) Inhibición por sensibilización

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Los resultados muestran inhibición en el crecimiento de *E. coli*, es decir, fue sensible al extracto P3772 a

partir de concentraciones de 100 hasta 0,78% (Figura 2). Sin embargo, la concentración de 3,12% de extracto metabólico presentó un efecto intermedio de inhibición, reflejado por el crecimiento bacteriano en 3 pozos, aunque se presentara efecto inhibitorio en las concentraciones de 1,56%, 0,78%, 0,39% y 0,19%. Se precisa que para garantizar la actividad inhibitoria se requieren concentraciones del extracto P3772 mayores a 3,12%. En cuanto a *S. aureus*, se presentó un comportamiento similar al observado para *E. coli*, es decir, sensibilidad de la bacteria patógena a concentraciones mayores de 3,12%. Estos resultados corroboran el efecto antimicrobiano del extracto P3772 como prometedor en la inhibición.

Perfil cromatográfico del extracto metabólico P3772

La comparación de los perfiles cromatográficos del cloranfenicol (1), utilizado como control, y el extracto metabólico (2), se pueden observar en la Figura 3.

Como se esperaba, el resultado muestra la presencia de varios compuestos en el extracto P3772, lo que se evidencia por la cantidad de picos observados en la muestra, sin embargo, se destaca la presencia de un pico bien definido que es eluido durante tiempo de retención 10,8 min. Se espera a futuro estudiar a profundidad la composición del extracto, de modo que se pueda definir cuál o cuáles son los compuestos relacionados con la actividad antibiótica.

Prueba de hemólisis

La prueba de hemólisis realizada con los aislados de actinobacterias realizados en Agar Sangre 3% y 5%, mostró ausencia de hemólisis para todos los aislados. Sin embargo, se requieren más estudios para poder garantizar la inocuidad de su uso como tratamiento.

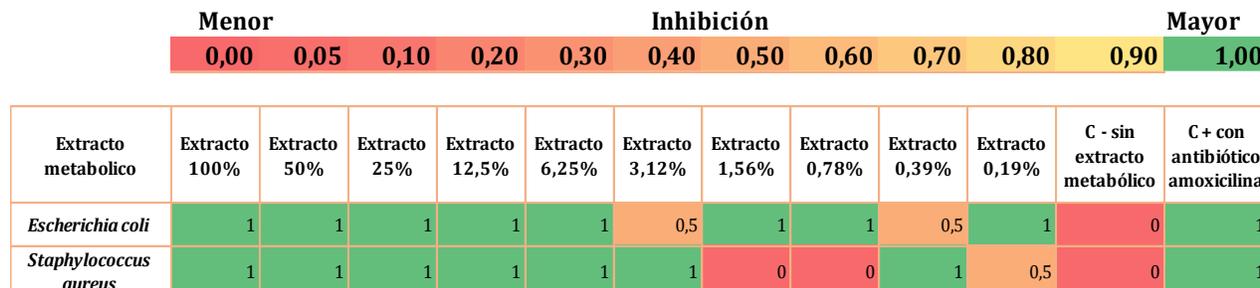


Figura 2. Matriz Heatmap CMI del extracto metabólico P3772, sobre las bacterias patógenas

C- negativo: Medio sin extracto metabólico ni antibiótico inoculado con la bacteria resistente, se observa crecimiento bacteriano.

C+ positivo: Medio con antibiótico amoxicilina inoculado con la bacteria resistente, se observa inhibición del crecimiento bacteriano

Cantidad de extracto metabólico en % v/v

Descripción de escala: 0 rosado sin efecto antibacteriano de la bacteria resistente, 1 verde con efecto antibacteriano de la bacteria resistente

HPLC P3772

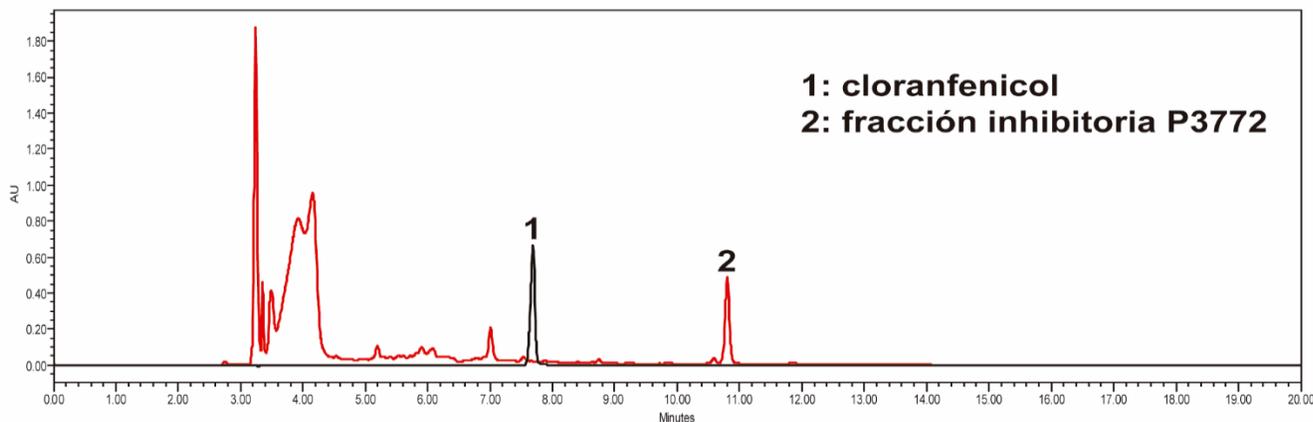


Figura 3. Perfil cromatográfico del (1) Control (cloranfenicol) Vs (2) Extracto metabólico

Discusión

La disminución de la eficacia de muchos antibióticos de uso común en la lucha contra las infecciones causadas por bacterias patógenas previamente descrita⁽²⁾, fue el principal incentivo para la realización de este estudio. Esa disminución se comprobó cuando se realizaron los ensayos de inhibición por parte de los antibióticos sobre *E. coli* y *S. aureus* aislados a partir de muestras obtenidas en hospitales de la región, con lo que se ratifica el fenómeno de la RAM en la región Nariñense. No obstante, es importante considerar estrategias exploratorias para encontrar nuevas fuentes de antibióticos en nichos sin explotación humana^(7,8) que puedan contribuir a subsanar esta problemática.

Como lo sugiere este estudio, la reserva del río Ñambí cuenta con las características agroecológicas y bioquímicas que pueden contribuir con la biodiversidad de microorganismos, ya que es un ecosistema altiplánico, con altas condiciones de humedad, presencia de materia orgánica, y rico en nutrientes⁽¹⁰⁾. En este trabajo se logró obtener 11 aislados bacterianos, cuatro de ellos pertenecientes al género *Streptomyces*, caracterizados por medio de la amplificación del gen 16S RNAr, sin embargo, aunque fue poco el número de aislados, fue similar a lo descrito por otros autores para este tipo de ecosistema⁽²²⁾. Algunas de las propiedades del suelo, tales como pH en un rango de valores entre 4,5 y 5,7, favorecen el crecimiento y biodiversidad de actinobacterias⁽²²⁾, los valores de pH determinados en las muestras de suelo de este trabajo estuvieron dentro de este mismo rango, asimismo los

correspondientes a materia orgánica disponible y la cantidad de nitrógeno, los cuales fueron altos⁽²²⁾, por lo que se presume se debió presentar mayor diversidad. Otro factor importante que pudo incidir es que los actinomicetos son bacterias mesófilas con crecimiento entre 25 °C y 30 °C⁽²¹⁾, y la reserva presenta una fluctuación de temperatura entre 18 °C y 25 °C⁽¹¹⁾, lo que influye considerablemente en la población de bacterias y podría explicar la poca variedad encontrada. Entre tanto, la disponibilidad de P, Mg, K y Cu en suelo es importante para el metabolismo bacteriano, ya que son elementos que actúan como cofactores enzimáticos⁽¹⁰⁾ y en este estudio fue baja. A pesar de eso, los niveles de K, Al, Fe, B, N y C, fueron más altos en los puntos de muestreo 1 y 2, de modo que se obtuvo mayor cantidad de aislados, ya que en estos se favoreció el crecimiento bacteriano, específicamente en los puntos de muestreo 1 y 2. Es importante considerar que se requieren más estudios para mejorar la caracterización de esa biodiversidad y así obtener más aislados de actinomicetos. Abarcar un área mayor para la toma de muestras de suelo y realizar muestreo en más puntos aumentará la posibilidad de obtener otros aislados y así obtener más fuentes probables de microorganismos productores de antibacterianos⁽²³⁾.

Por otro lado, en este estudio, la finalidad de la búsqueda de actinomicetos, además de ser un primer acercamiento a la biodiversidad de estos en los ecosistemas de la región, fue determinar la potencial actividad antimicrobiana por extractos, productos del metabolismo secundario de los actinomicetos en condiciones de estrés. Diferentes autores han

postulado al acetato de etilo como extractor, pues permite la separación de compuestos medianamente polares^(5,23); sin embargo, lo obtenido es un extracto bruto por lo que se dificulta establecer un precedente sobre su composición, ya que es grande la gama de compuestos que se pueden extraer en su aplicación. Se requiere de más estudios bioquímicos para su caracterización.

En este trabajo, se demostró la eficiencia del efecto antibacteriano de algunos de los extractos obtenidos sobre las cepas de *E. coli* y *S. aureus* multidrogo-resistentes, especialmente cuando se trató del obtenido a partir del aislado P3772, cuya actividad se presentó sobre ambas bacterias. Otros autores han descrito este mismo resultado, en sus estudios sobre actinomicetos obtenidos, al igual que en este estudio, en lugares poco explorados^(5,9,21,22). No obstante, la falta de información sobre la composición propia del extracto no permite puntualizar sobre los efectos que este tiene sobre las bacterias multidrogo-resistentes estudiadas. Pese a esto, la presencia de actividad inhibitoria de extracto de P3772 a tan baja concentración (>3,12%) determinada por la prueba de CMI permite concluir que el efecto inhibitorio sobre las bacterias multidrogo-resistentes analizadas fue contundente, y similar a lo descrito en otras investigaciones relacionadas con actinobacterias^(5,21,22,24). Este resultado junto a la ausencia de hemólisis testada en agar sangre sugieren que este extracto es una nueva fuente prometedora de antibacterianos, una vez se profundice en estudios bioquímicos sobre su composición.

Conclusiones

La reserva del Río Ñambi presenta las condiciones bioquímicas y agroecológicas necesarias para permitir el desarrollo de actinobacterias capaces de producir compuestos con actividad antibacteriana sobre cepas multidrogo-resistentes de origen hospitalario tales como *E. coli* y *S. aureus*.

El extracto metabólico producido por el aislado P3772 identificado molecularmente como *Streptomyces* sp. presentó la mejor actividad inhibitoria contra las bacterias multidrogo-resistentes *E. coli* y *S. aureus* en concentraciones mayores a 3,12% determinado por CMI.

Agradecimientos

A la Corporación CEIBA y al Centro de Estudios Ambientales (CEA) por su apoyo y parcial

financiación del proyecto, y a Cristian Flórez de la Reserva Rio Nambí por permitir el ingreso y colecta de muestras de suelo

Conflicto de intereses: Ninguno declarado por los autores.

Referencias

1. Levin-Reisman I, Ronin I, Gefen O, Braniss I, Shoshani N, Balaban NQ. Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. *Science* [Internet]. 2017;355(6327):826–30. DOI: 10.1126/science.aaj2191.
2. Arenas NE, Melo VM. Producción pecuaria y emergencia de antibiótico resistencia en Colombia: Revisión sistemática. *Infectio* [Internet]. 2018;22(2):110–9. DOI: 10.22354/in.v22i2.717.
3. Mensa J, Barberán J, Soriano A, Llinares P, Marco F, Cantón R, et al. Antibiotic Selection Treatment Acute invasive infections by *Pseudomonas Aeruginosa*: Guidelines by the Spanish Society of Chemotherapy. *Rev Esp Quim* [Internet]. 2018;31(1):78–100. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29480677>
4. Bengtsson-Palme J, Kristiansson E, Larsson DGJ. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 2018;42(1):68–80. DOI: 10.1093/femsre/fux053.
5. Ameen F, Reda SA, El-Shatoury SA, Riad EM, Enany ME, Alarfaj AA. Prevalence of antibiotic resistant mastitis pathogens in dairy cows in Egypt and potential biological control agents produced from plant endophytic actinobacteria. *Saudi J Biol Sci* [Internet]. 2019;26(7):1492–8. DOI: 10.1016/j.sjbs.2019.09.008.
6. Gil M, Cruz C, Leal N, Otth L, Arce ME, Zaror A, et al. Características epidemiológicas de la infección por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en el Hospital Clínico Regional de Valdivia. *Cuad Cirugía* [Internet]. 2000;14(1):18–22. DOI: 10.4206/cuad.cir.2000.v14n1-04.
7. Terreni M, Tacconi M, Pregnotato M. New Antibiotics for Multidrug-Resistant Bacterial Strains: Latest Research Developments and Future Perspectives. *Molecules* [Internet]. 2021;26(9):2671. DOI: 10.3390/molecules26092671.
8. Nafis A, Elhedar N, Oubaha B, Samri SE, Niedermeyer T, Ouhdouch Y, et al. Screening for non-polyenic antifungal produced by actinobacteria from Moroccan habitats: Assessment of antimycin A19 production by *Streptomyces albidoflavus* AS25. *Int J Mol Cell Med* [Internet]. 2018;7(2):133–45. DOI: 10.22088/IJMCM.BUMS.7.2.133.
9. Parada RB, Marguet ER, Vallejo M. Aislamiento y caracterización parcial de actinomicetos de suelos con actividad antimicrobiana contra bacterias multidrogo-resistentes. *Rev Colomb Biotecnol* [Internet]. 2017;XIX(2):15–23. DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.64098.
10. Ghorbani-Nasrabadi R, Greiner R, Alikhani HA, Hamed J, Yakhchali B. Distribution of actinomycetes in different soil ecosystems and effect of media composition on extracellular phosphatase activity. *J Soil Sci Plant Nutr* [Internet]. 2013;13(1):223–36. DOI: 10.4067/S0718-95162013005000020.
11. Kumar S, Suyal DC, Yadav A, Shouche Y, Goel R. Microbial diversity and soil physicochemical characteristic of higher

- altitude. *PLoS One* [Internet]. 2019;14(3):e0213844. DOI: 10.1371/journal.pone.0213844.
12. Padilla Gil DN. Las chinches semi-acuáticas de la reserva natural Río Nambí (Nariño), Colombia. *Acta Biol Colomb* [Internet]. 2016;21(1):201-6. DOI: 10.15446/abc.v21n1.50001.
 13. Martínez-Torres D, Flórez E. En: Flores E, Romero-Ortíz C, López DS. Clase Diplopoda. Los artrópodos de la reserva natural río Nambí. Bogotá D.C: Universidad Nacional de Colombia; 2015. p. 264-90. Disponible en: http://168.176.14.11/fileadmin/content/icn/documentos/Los_Artrópodos_de_la_Reserva_Natural_Rio_Nambi.pdf
 14. Quiroga AR, Galantini JA, Studdert GA. La materia organica como indicador de cambios en la calidad de los suelos influenciados por el manejo. *Fertil suelos y Fertil Cultiv*. 2017;53-89.
 15. Tomás R, Cano M, Santamarta JC, Hernández-Gutiérrez LE. New Approaches for Teaching Soil and Rock Mechanics Using Information and Communication Technologies. *Procedia - Soc Behav Sci* [Internet]. 2015;191:1644-9. DOI: 10.1016/j.sbspro.2015.04.477.
 16. Evangelista Martinez Z, Quiñones Aguilar EE, Rincón Enríquez G. Potencial biotecnológico de las actinobacterias aisladas de suelos de México como fuente natural de moléculas bioactivas: compuestos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas. *Temas Cienc Tecnol* [Internet]. 2017;21(63):39-51. Disponible en: https://www.utm.mx/edi_anteriores/temas63/T63_E011-2017.pdf
 17. van Bergeijk DA, Terlouw BR, Medema MH, van Wezel GP. Ecology and genomics of Actinobacteria: new concepts for natural product discovery. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2020;18(10):546-58. DOI: 10.1038/s41579-020-0379-y.
 18. Chandrakar S, Gupta AK. Actinomycin-Producing Endophytic *Streptomyces parvulus* Associated with Root of Aloe vera and Optimization of Conditions for Antibiotic Production. *Probiotics Antimicrob Proteins* [Internet]. 2019;11(3):1055-69. DOI: 10.1007/s12602-018-9451-6.
 19. Floros DJ, Jensen PR, Dorrestein PC, Koyama N. A metabolomics guided exploration of marine natural product chemical space. *Metabolomics* [Internet]. 2016;12(9):145. DOI: 10.1007/s11306-016-1087-5.
 20. Guerrero-Ceballos DL, Burbano-Rosero EM, Ibarra-Mondragon E. Characterization of antibiotic-resistant *Escherichia coli* associated with urinary tract infections in Southern Colombia. *Univ Sci* [Internet]. 2020;25(3):463-88. Disponible en: <https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/view/27127>
 21. Carvalho T, van der Sand S. Evaluation of antimicrobial activity of the endophytic actinomycete R18(6) against multiresistant Gram-negative bacteria. *An Acad Bras Cienc* [Internet]. 2016;88(1):155-63. DOI: 10.1590/0001-3765201620140655.
 22. Lamilla C, Braga D, Castro R, Guimarães C, de Castilho LVA, Freire DMG, et al. *Streptomyces luridus* So3.2 from Antarctic soil as a novel producer of compounds with bioemulsification potential. *PLoS One* [Internet]. 2018;13(4):e0196054. DOI: 10.1371/journal.pone.0196054.
 23. Sharma P, Thakur D. Antimicrobial biosynthetic potential and diversity of culturable soil actinobacteria from forest ecosystems of Northeast India. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):4104. DOI: 10.1038/s41598-020-60968-6.
 24. Stevenson A, Hallsworth JE. Water and temperature relations of soil Actinobacteria. *Environ Microbiol Rep* [Internet]. 2014;6(6):744-55. DOI: 10.1111/1758-2229.12199.