



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
Facultad de Ciencias
Escuela de Ciencias

Profesor Patrocinante:

Biól. Mar., MSc Sergio Leiva P.

Instituto de Microbiología

Facultad de Ciencias

**Aislamiento, caracterización y actividad antimicrobiana de la
Microbiota Bacteriana de agua y sedimentos marinos de la costa de Valdivia**

**Tesis de Grado presentada como parte de los
requisito para optar al grado de
Licenciado en Ciencias
Biológicas**

Carolina Andrea Mancilla Mancilla

Valdivia Chile 2003

Dedicatoria

Este trabajo se los dedico a mis padres y hermanos, por sus constantes esfuerzos y sacrificios y a mis tíos Adriana y Ernesto, por su continua preocupación y apoyo.

Agradecimientos

A mi profesor patrocinante, MSc Sergio Leiva, por su invaluable apoyo científico y la motivación entregada en el transcurso de esta tesis.

A los profesores informantes, Dr. Héctor García-Quintana y Dr. Eduardo Valenzuela F. por su orientación y análisis crítico de este trabajo.

Especial agradecimiento debo a todas las personas que conforman el Instituto de Microbiología de la Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, por las facilidades otorgadas para la realización de esta tesis.

Este trabajo se realizó en el marco del Proyecto DID S-2002-26.

INDICE DE CONTENIDOS

	Página
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	3
3. INTRODUCCION	5
4. MATERIAL Y METODOS	12
4.1 Area de estudio	12
4.2 Aislamiento de bacterias heterotróficas y oligotróficas viables	13
4.3 Aislamiento de actinomicetes	13
4.4 Ensayo de actividad antimicrobiana	14
4.5 Análisis estadístico	14
5. RESULTADOS	15
5.1 Bacterias heterotróficas	15
5.1.1 Recuentos bacterianos	15
5.1.2 Identificación de bacterias heterotróficas	16
5.1.3 Actividad antimicrobiana de cepas heterotróficas	17
5.2 Bacterias oligotróficas viables	20
5.2.1 Recuentos bacterianos	20
5.2.2 Identificación de bacterias oligotróficas	21
5.2.3 Actividad antimicrobiana de cepas oligotróficas	22
5.3 Actinomicetes	25

	Página
5.3.1 Aislamiento de actinomicetes	25
5.3.2 Identificación de los actinomicetes aislados	25
5.3.3 Actividad antimicrobiana de las cepas aisladas	26
6. DISCUSION	31
7. CONCLUSIONES	42
ANEXOS	43
REFERENCIAS	44

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Actividad antimicrobiana de bacterias heterotróficas viables contra cepas de referencia.	18
Tabla 2. Caracterización morfológica y fisiológica de las 5 cepas bacterianas heterotróficas con actividad antimicrobiana.	19
Tabla 3. Actividad antimicrobiana de bacterias oligotróficas viables contra cepas de referencia.	23
Tabla 4. Características morfológicas y fisiológicas de las dos cepas oligotróficas con actividad antimicrobiana.	24
Tabla 5. Número de cepas de actinomicetes aislados de agua, sedimentos y tejidos de invertebrados marinos de la costa de Valdivia.	25
Tabla 6. Distribución de los <i>Streptomyces</i> aislados según el color de su micelio aéreo maduro.	26
Tabla 7. Actividad antimicrobiana de 31 actinomicetes marinos contra cepas de referencia.	28

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Localización de los sitios de muestreo.	12
Figura 2. Recuentos viables de bacterias heterotróficas en agua y sedimento de los 3 sitios de muestreo de la costa de Valdivia.	15
Figura 3. Distribución porcentual de bacterias heterotróficas viables en muestras de agua 3 sitios de muestreo de la costa de Valdivia.	16
Figura 4. Distribución porcentual de bacterias heterotrófica viables en muestras de sedimentos en 3 sitios de muestreo de la costa de Valdivia.	17
Figura 5. Recuentos viables de bacterias oligotróficas en agua y sedimento de los 3 sitios de muestreo de la costa de Valdivia.	20
Figura 6. Distribución porcentual de bacterias oligotróficas viables en muestras de agua 3 sitios de muestreo de la costa de Valdivia.	21
Figura 7. Distribución porcentual de bacterias oligotróficas en muestras de sedimentos de 3 sitios de muestreo de la costa de Valdivia.	22
Figura 8. Actividad antimicrobiana de cepas bacterianas oligotróficas y heterotróficas sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	23
Figura 9. Especies bacterianas y fúngicas inhibidas por actinomicetes marinos.	27
Figura 10. Actividad antimicrobiana de cepas de actinomicetes marinos sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6639.	29
Figura 11. Actividad antimicrobiana de cepas de actinomicetes marinos sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 90029.	30

1. RESUMEN

Introducción: Debido a la selección y diseminación de poblaciones de microorganismos resistentes, es imperativo buscar nuevos antimicrobianos, más eficientes y de mayor espectro y tolerancia para combatirlos. Se considera que el estudio de los metabolitos secundarios obtenidos a partir de microorganismos marinos es una potencial fuente para el descubrimiento de nuevos agentes antimicrobianos. **Objetivo principal:** Investigar la capacidad antimicrobiana de la microbiota bacteriana viable que se aísla de aguas y sedimentos marinos, en 3 sitios de la costa de Valdivia: Los Molinos, San Ignacio y Playa Rosada. **Material y Métodos.** Los actinomicetes se pesquisarón a partir de muestras de agua y sedimentos marinos, utilizando agar caseína-almidón. Para el aislamiento de bacterias heterotróficas se utilizó agar marino 2216 y para bacterias oligotróficas un medio con baja concentración de nutrientes. En los ensayos de antagonismo se siguió el método de difusión en disco, con cepas vivas sobre las especies bacterianas de referencia: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y sobre la levadura *Candida albicans* ATCC 90029. **Resultados.** Los recuentos promedios de bacterias heterotróficas en la columna de agua fluctuaron entre 509 y 766 ufc/mL y en los sedimentos entre 39.400 y 68.277 ufc/g, siendo *Vibrio* el género dominante en ambos casos. Se aislaron 5 cepas heterotróficas antagónicas, destacando las cepas UACH 54.5 y UACH 54.10, que mostraron actividad contra *S. aureus*. Para las bacterias oligotróficas, los recuentos promedios en la columna de agua fluctuaron entre 396 y 3.815 ufc/ml, siendo las especies de *Vibrio* las predominantes, mientras que en los sedimentos los recuentos fluctuaron entre 46.333 y 75.600 ufc/g, siendo el género dominante *Alcaligenes*. Sólo las cepas oligotróficas UACH 26.5 y UACH 27.2 exhibieron antagonismo, el cual se dirigió contra *S. aureus*. Se aislaron 45 cepas de

actinomycetes, mayoritariamente *Streptomyces* sp. (86,7 %). De ellas, 31 (68,9 %) exhibieron actividad antimicrobiana, principalmente contra *C. albicans* y *B. subtilis*. Algunas cepas presentaron un amplio espectro de inhibición, como la cepa UACH 024 (*Streptomyces* sp) que inhibió a todas las cepas indicadoras. **Conclusiones:** Aguas y sedimentos marinos del litoral de la costa Valdiviana serían un importante reservorio de bacterias antagónicas, constituyendo una fuente potencial de nuevos agentes antimicrobianos.

2. SUMMARY

Isolation, characterization and antimicrobial activity of the bacterial microbiota of seawater and marine sediments of the Valdivia coast, Chile.

Background: The selection and spread of populations of resistant microorganisms. It is imperative to search for new antimicrobials with more efficacy, spectra and tolerance. In this sense, marine microorganisms have shown to be a potential source of new drugs.

Aim: To investigate the antimicrobial potential of the viable bacterial microbiota from seawater and sediments of 3 sampling stations of the Valdivia coast: Los Molinos, San Ignacio and Playa Rosada. **Material and Methods.** Actinomycetes were isolated from seawater and marine sediment samples using casein-starch agar. Heterotrophic and oligotrophic bacteria were isolated using marine agar 2216 and a low-nutrient medium, respectively. The antimicrobial activity against three reference bacterial species (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633) and one reference fungal strain (*Candida albicans* ATCC 90029) was tested using the disc diffusion method. **Results.** The mean counts of heterotrophic bacteria in the water column ranged from 509 to 766 ufc/mL and in the sediments from 39.400 to 68.277 ufc/g, being always *Vibrio* the dominant genus. Five isolates showed antagonisms, like the strains UACH 54.5 and UACH 54.10 with activity against *S. aureus*. The mean counts of oligotrophic bacteria in the seawater ranged from 396 to 3.815 ufc/ml, being the dominant *Vibrio* sp. In the sediments the oligotrophic bacterial counts ranged from 46.333 and 75.600 ufc/g, being *Alcaligenes* sp the most representative. Only the strains UACH 26.5 and UACH 27.2 showed antimicrobial activity, inhibiting *S. aureus*. A total of 45 strains of

actinomycetes were isolated, mainly *Streptomyces* sp (86,7 %). Thirty one strains (68,9 %) showed antimicrobial activity, mainly against *C. albicans* and *B. subtilis*. Some isolates inhibited a wide spectrum of indicator strains, like UACH 024 strain (*Streptomyces* sp) that inhibited all the indicator strains. **Conclusions:** Seawater and marine sediments of the Valdivia coast would be an important reservoir of antagonistic bacteria, being a potential source of novel antimicrobial drugs.

3. INTRODUCCION

La Naturaleza ha constituido por miles de años una fuente de agentes medicinales para el hombre. Es impresionante el número de drogas que se han aislado desde fuentes naturales, especialmente plantas, las que han formado la base de un sistema de medicina durante milenios (Cragg & Newman, 2001). El siglo pasado fue testigo de la creciente importancia de los microorganismos como productores de antibióticos y otras drogas. Desde el descubrimiento casual de la penicilina por Fleming en 1929 a partir de un cultivo de *Penicillium notatum* (Tortora et al., 2001), hecho que inauguró la “Edad Dorada de los Antibióticos”, ha habido una intensa investigación destinada a descubrir nuevos productos de interés biomédico a partir de microorganismos del ambiente. Estos han incluido antibióticos como penicilinas (desde especies de *Penicillium*), cefalosporinas (desde *Cephalosporium acremonium*), aminoglicósidos, tetraciclinas, agentes inmunosupresores como la ciclosporina (a partir de *Trichoderma* y *Tolypocladium*), agentes que bajan el colesterol, como la mevastatina (desde especies de *Penicillium*) y lovastatina (de *Aspergillus*), drogas antihelmínticas y antiparasitarias como las ivermectinas (desde *Streptomyces*), antitumorales como las familias de compuestos del ácido aureólico, mitomicina y actinomicina, e incluso agentes antidiabéticos (Cragg & Newman, 2001).

De acuerdo a Fenical (1993), en los últimos 60 años se han descubierto entre 30.000 y 50.000 productos naturales desde microorganismos, de los cuales más de 10.000 son biológicamente activos y más de 8.000 son antibióticos y agentes antitumorales. Debido a que la mayoría de estos compuestos tienen un origen terrestre, el ritmo de descubrimiento de moléculas nuevas ha disminuido notoriamente y se estima que más del 90 % de los cultivos de

microorganismos terrestres producen sustancias ya conocidas o con pequeñas variaciones de una molécula ya existente (Fenical, 1993). Hoy en día, se considera que los futuros programas de “screening” de nuevas drogas, deben considerar la búsqueda de nuevas especies o géneros de microorganismos, así como su búsqueda en ambientes no explorados anteriormente (Nolan & Cross, 1988). Esta disminución en la tasa de hallazgo de nuevos metabolitos ha llevado a la búsqueda de nuevos compuestos en el ambiente acuático, que ofrece la posibilidad de encontrar cepas silvestres aún no descritas y que podrían producir nuevos metabolitos secundarios farmacológicamente relevantes (Fenical, 1993; Jensen & Fenical, 1994; Leiva et al., 2000; Hentschel et al., 2001).

Actualmente, se considera que el estudio de los metabolitos bioactivos obtenidos a partir de microorganismos acuáticos es una rica fuente para el descubrimiento de nuevas drogas. La lista de compuestos obtenidos a partir de microorganismos acuáticos incluyen antimicrobianos, anticancerígenos y antiinflamatorios, muchos de los cuales pertenecen a clases químicas no descritas en microorganismos terrestres. Ejemplos de ello son dos productos naturales marinos de naturaleza anticancerígena, briostatina y didemnina B (Pettit et al., 1982; Rinehart et al., 1981), estando ambos ya en etapa de evaluación clínica (Jensen & Fenical, 1994). El más notable de estos compuestos es briostatina, aislado del briozoo *Bugula neritina*, agente con un amplio espectro de actividades biológicas, entre las que destaca su promisorio actividad contra melanomas en estudios de fase I (Cragg & Newman, 2001).

Los océanos poseen la mayor riqueza filogenética sobre la tierra, presentando el mayor número de animales, plantas y microorganismos. Ellos han desarrollado una serie de estrategias

metabólicas y fisiológicas, que les permitan sobrevivir en este medio extremo, lo cual puede significar la producción de metabolitos estructuralmente distintos a los encontrados en sus contrapartes terrestres (Jensen & Fenical, 1994).

La pesquisa de cepas productoras de sustancias bioactivas en el ambiente marino ha abarcado hábitats tan diversos como: columna de agua, sedimentos y tejidos de invertebrados. Las expectativas futuras de la utilización de actinomicetes con fines industriales ha conducido a los investigadores locales a la búsqueda de cepas de actinomicetes a partir de agua y sedimentos acuáticos (Leiva et al., 2000). Entre los actinomicetes, las cepas del género *Streptomyces* son unas de las de mayor importancia para la obtención de sustancias de interés biológico como antibióticos, antifúngicos y antitumorales. No obstante, nuevos metabolitos se han reportado no solamente de actinomicetes, sino también de otros grupos bacterianos e.g. bacterias heterotróficas como *Alteromonas*, *Chromobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, cianobacterias, hongos y microalgas (Girones et al., 1989; Fenical, 1993; Jensen & Fenical, 1994; Uribe et al., 1994; Heyduck-Söllner & Fisher, 2000).

Numerosos estudios han demostrado el potencial productor de metabolitos antimicrobianos novedales en bacterias marinas (Stout et al., 1991; Biabani et al., 1997; Fudou et al., 2001; Nagao et al., 2001). Muchas de las moléculas aisladas desde bacterias marinas poseen cualidades extraordinarias, como su halogenación, siendo notable la presencia de átomos de cloro o bromo. Esta halogenación rara vez se encuentra en metabolitos de origen terrestre.

En el ambiente marino los antibióticos y otros metabolitos secundarios cumplirían funciones de supervivencia, confiriéndoles a los microorganismos productores una ventaja selectiva respecto a otras poblaciones microbianas que compiten por el mismo nicho (Vining, 1990). Fudou et al. (2001) aislaron desde una myxobacteria marina el primer antibiótico: haliangicina. Este compuesto tiene una potente actividad contra hongos filamentosos, comparable a las de amfotericina B y nistatina, además de poseer actividad contra Oomycetes. Nagao et al. (2001) identificaron 2 nuevas macrolactinas desde una cepa marina de *Bacillus* aisladas desde el alga *Schizymenia dubyi*. Estas macrolactinas mostraron actividad contra *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, pero no contra *Escherichia coli*. Estudios realizados por Barcina et al. (1987) con cepas de *Streptomyces* aisladas desde agua y sedimentos marinos, demostraron actividad inhibitoria principalmente contra Gram positivos, tales como *S. aureus*, *B. subtilis* y *Streptococcus faecalis*. Pisano et al. (1989, 1992) aislaron desde sedimentos marinos cepas de actinomycetes con actividad antagónica contra hongos filamentosos (*Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme* y *Trichoderma viridae*) y levaduriformes (*Candida albicans*, *Candida kruzei*). Estos autores encontraron que la actividad antifúngica era mayoritariamente debida a polienos como hexaenos.

Uno de los sucesos que tienen gran importancia en el ambiente marino, es el rol de las bacterias simbióticas en la producción de metabolitos secundarios. Las bacterias asociadas con invertebrados marinos y con algas, son un claro ejemplo de interacciones que demuestran una variedad de estrategias de colonización y crecimiento utilizadas por algunas bacterias, tal vez inhibiendo microorganismos competidores gracias a la producción de antimicrobianos. Dado que los invertebrados marinos carecen de una respuesta inmune de tipo celular y están expuestos a

una gran variedad de patógenos microbianos, se postula que la elaboración de metabolitos secundarios como mecanismo defensivo es una estrategia destinada a la disuasión de poblaciones microbianas dañinas (Engel et al., 2002). Una interrogante aún no resuelta es saber si en realidad son las bacterias o son los organismos invertebrados, los que verdaderamente producen dichos metabolitos. El rol de los metabolitos secundarios en las interacciones del ambiente marino no se ha definido, pero indudablemente representan una veta a explorar para la obtención de nuevas moléculas. En esta línea, los estudios en esponjas marinas han proporcionado mucha información sobre la distribución de los microorganismos en los tejidos de invertebrados, así como el descubrimiento de metabolitos no descritos previamente. Hentschel et al. (2001) aislaron desde las esponjas *Aplysina aerophoba* y *Aplysina cavernicola* cepas de *Pseudoalteromonas* y α -Proteobacterias con actividad antimicrobiana contra cepas de referencia Gram negativas y Gram positivas. Stierle et al. (1988) identificaron una serie de dicetopiperazinas desde cultivos de *Micrococcus* sp aislados desde la esponja *Tedania ignis*. Estas moléculas habían sido erróneamente adscritas a la esponja.

El uso inapropiado de los antibióticos para combatir las enfermedades infecciosas ha llevado a un aumento en el número de bacterias y hongos patógenos que muestran resistencia a las drogas tradicionales. Hoy en día se acepta que existe una relación establecida, pero compleja, entre el consumo de antimicrobianos y la emergencia de patógenos resistentes a las drogas tradicionales. El ejemplo más notable lo constituyen algunas bacterias Gram negativas como *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Pseudomonas* que inactivan algunos antibióticos a través de β lactamasas. Si bien la prevalencia de la resistencia a los hongos es inferior a la de las bacterias, hay una creciente preocupación por el aumento de las micosis resistentes a los tratamientos

tradicionales con antifúngicos. Ejemplo de ello, lo constituye la resistencia de *C. albicans* a los azoles. Se ha demostrado que algunas cepas de *Candida* aisladas de pacientes sometidos a terapias con fluconazol de larga duración, tienen niveles elevados de proteínas transportadoras (MFS) (ABC) que provocan la salida del fármaco, reduciendo así su acumulación intracelular (Hernández et al., 1997). Como resultado, muchos antibióticos han perdido su eficacia y algunos ya no son útiles para tratar determinadas infecciones.

Chile tiene, proporcionalmente con relación a su superficie el litoral más extenso y diversificado y una microbiota poco estudiada, la cual podría ser peculiar y deparar el hallazgo de cepas de utilidad industrial. Ya que las bacterias marinas son una fuente relativamente inexplorada de sustancias bioactivas, a fin de aprovechar eficientemente este recurso es necesario investigar su distribución en este hábitat. Resultados preliminares indican que la microbiota del ambiente marino de la costa de Valdivia posee un interesante potencial como fuente de metabolitos antagonistas (Uribe et al., 1994). El estudio de sus propiedades antagonistas y la caracterización del producto activo pueden llevar al descubrimiento de nuevas drogas antimicrobianas. La utilización de bacterias marinas como fuentes de nuevas sustancias bioactivas es comparativamente reciente, pero presenta promisorias proyecciones. Esta investigación se presenta como un estudio de línea base, destinado a comprender la distribución de algunos grupos bacterianos en el ambiente marino de la costa de Valdivia, con énfasis en los actinomicetes, y evaluar su potencial antimicrobiano. Los resultados servirán como base para futuros estudios, donde se intente extraer e identificar el principio activo responsable de la actividad antimicrobiana.

El objetivo general de este estudio es investigar el potencial antimicrobiano de la microbiota bacteriana viable de aguas y sedimentos marinos de la costa de Valdivia. Se plantea la hipótesis que, **en el agua y sedimentos marinos de la costa de Valdivia, algunas cepas de la población bacteriana cultivable presentan actividad antagónica sobre bacterias y hongos de referencia.**

Para comprobar esta hipótesis se plantean los siguientes objetivos específicos:

- a) Cuantificar algunas poblaciones bacterianas cultivables de aguas y sedimentos marinos de la costa de Valdivia. El análisis se enfocará en el estudio de bacterias oligotróficas y heterotróficas viables y actinomycetes.
- b) Identificar hasta nivel de género las cepas bacterianas aisladas.
- c) Investigar la actividad antimicrobiana de las cepas aisladas contra cepas de bacterias y hongos de referencia.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1 Area de estudio. Las muestras se colectaron en tres estaciones localizadas en el litoral de la provincia de Valdivia, Los Molinos, San Ignacio y Playa Rosada (Fig. 1). En cada lugar se establecieron varios puntos de muestreo, a una distancia entre 100 y 200 m de la costa. Las muestras de agua se colectaron a 1 m de profundidad con envases estériles. Las muestras de sedimento se obtuvieron con draga Eckman a profundidades entre 8 y 20 m y se traspasaron a envases de polietileno estériles. Las muestras se transportaron en cajas térmicas a 4° C para ser procesadas de inmediato al Instituto de Microbiología de la Universidad Austral de Chile.

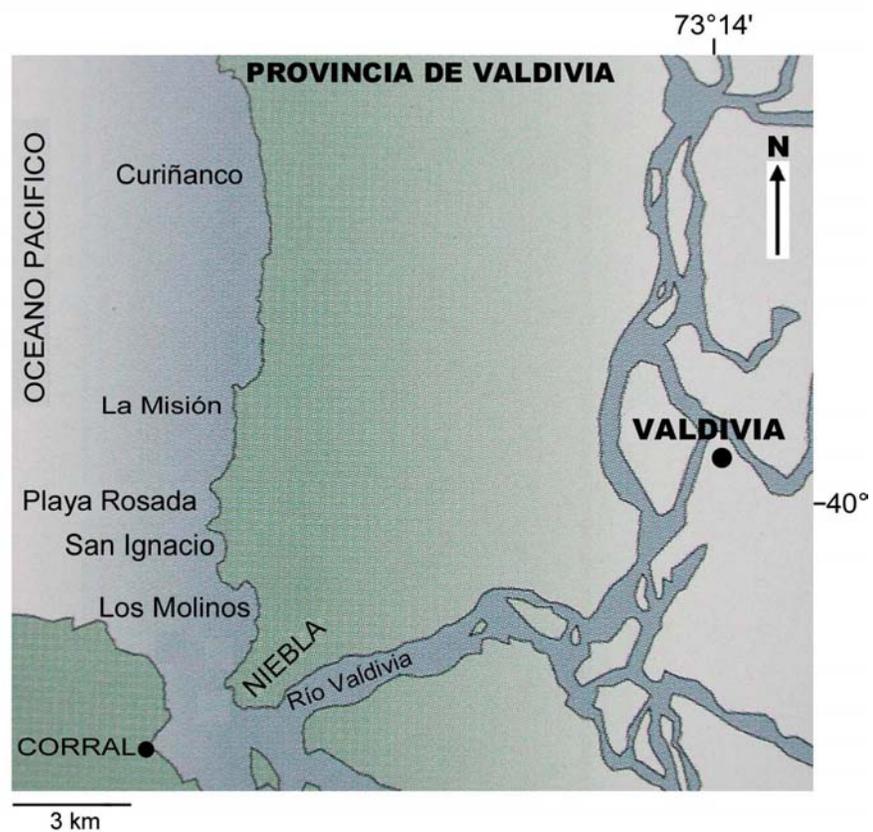


Figura 1. Localización de los sitios de muestreo.

4.2 Aislamiento de bacterias heterotróficas y oligotróficas viables. Para el aislamiento de bacterias heterotróficas, se sembraron diluciones de las muestras de agua y sedimento en la superficie de placas con agar marino 2216 (Difco). Para el aislamiento de bacterias oligotróficas se utilizó un medio con baja concentración de nutrientes, consistente de triptona (0,05 %) (Difco), extracto de levadura (0,005 %) (Difco), glicerofosfato de Na (0,01 %) (Sigma) y agar noble (1,2 %) (Difco), los cuales se disolvieron en agua de mar proveniente del lugar de muestreo, la cual fue esterilizada previamente por filtración (Sartorius 0,22 μm) (Santavy et al., 1990). Todas las placas se incubaron a $20 \pm 1^\circ \text{C}$ hasta por 5 días. Desde cada placa de aislamiento se seleccionaron al azar un número entre 3 y 5 colonias las cuales se repicaron en agar marino 2216 o agar inclinado para bacterias oligotróficas. Las cepas escogidas se preservaron a 4°C en tubos con el medio de aislamiento inclinado, hasta llevar a cabo los protocolos de identificación y los ensayos de antagonismo. Para la identificación de los aislados hasta nivel de género se siguieron los esquemas propuestos por Holt et al. (1994). La caracterización de los aislados que exhibieron antagonismo se realizó mediante el sistema de identificación API 20 NE (bioMérieux).

4.3 Aislamiento de actinomicetes. Las muestras de agua y sedimento se mantuvieron en un baño de agua a 50°C por 60 min. Este tratamiento ha demostrado ser efectivo para reducir el número de bacterias no deseadas, favoreciendo el crecimiento de los actinomicetes (Pisano et al., 1986; Takisawa et al., 1993). Diluciones de las muestras de agua y sedimento se sembraron en triplicado en placas de agar caseína-almidón, ambos con una base de agua de mar del lugar de muestreo (70 %) y suplementados con nistatina y cicloheximida (25 y 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente) para inhibir el crecimiento de hongos (Küster & Williams, 1964; Takisawa et al., 1993). Las placas se incubaron a $20 \pm 1^\circ \text{C}$ por lo menos 28 días. Las cepas aisladas se

preservaron a 4° C en agar extracto de levadura-extracto de malta inclinado (ISP-2) hasta su identificación y realización de ensayos de antagonismo. Los aislamientos se identificaron en base a criterios morfológicos siguiendo los esquemas de Holt et al. (1994). Para ello, se utilizó la técnica de cultivo en laminilla, que consiste en introducir cubreobjetos estériles en una inclinación de 45° en placas con medio ISP-2 previamente sembradas con la cepa a analizar. Después de una incubación a $20 \pm 1^\circ$ C por dos semanas, los cubreobjetos se retiraron, se fijaron por calor, se tiñeron con Gram y se observaron al microscopio (Holt et al., 1994; Díaz Corrales et al., 1997). Aquellas cepas identificadas como *Streptomyces* spp se agruparon en series según el color de su micelio aéreo maduro, para lo cual se siguieron los protocolos descritos por Shirling & Gottlieb (1966) utilizando medio ISP-2. A cada una de las cepas aisladas se le asignó una clave y se traspasaron a cepario, esta clave corresponde a las siglas UACH- N° de muestra. N° de cepa.

4.4 Ensayo de actividad antimicrobiana. Se ensayó la actividad antimicrobiana de las bacterias aisladas mediante la técnica de difusión en disco, que consiste en confrontar discos de agar ISP-2 (11 mm de diámetro) inoculados con las cepas vivas de actinomycetes a ensayar, o agar 2216 con la cepa bacteriana heterotrófica u oligotrófica, con tapices de las cepas de prueba *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 en agar Mueller Hinton (Difco) y *Candida albicans* ATCC 90029 en agar dextrosa Sabouraud (Difco) (Hentschel et al., 2001). Las placas se incubaron a $20 \pm 1^\circ$ C por 24 h para posteriormente medir el diámetro de la zona de inhibición.

4.5 Análisis estadístico. Para comparar los recuentos bacterianos entre las estaciones de muestreo se empleó la prueba *t* (Zar, 1999).

5. RESULTADOS

5.1 Bacterias heterotróficas

5.1.1 Recuentos bacterianos

Los recuentos de bacterias heterotróficas viables en el agua y sedimento en los tres sitios, se muestran en la figura 2. Los recuentos bacterianos en la columna de agua en San Ignacio fluctuaron entre 477 y 1.197 ufc/ml de bacterias (promedio = 766 ufc/mL). Por su parte, en Playa Rosada los recuentos fluctuaron entre 260 y 725 ufc/mL (promedio= 509 ufc/mL). A su vez, en las muestras de sedimento los recuentos fueron dos órdenes de magnitud mayores a los de las muestras de agua. En los Molinos éstos fluctuaron entre 35.333 y 114.000 ufc/g (promedio = 68.277 ufc/g), mientras que en San Ignacio fluctuaron entre 31.000 y 104.500 ufc/g (promedio = 47.966). El análisis estadístico no reveló diferencias significativas en los recuentos de bacterias heterotróficas en el agua y sedimento de las 3 estaciones de muestreo (Anexo 1).

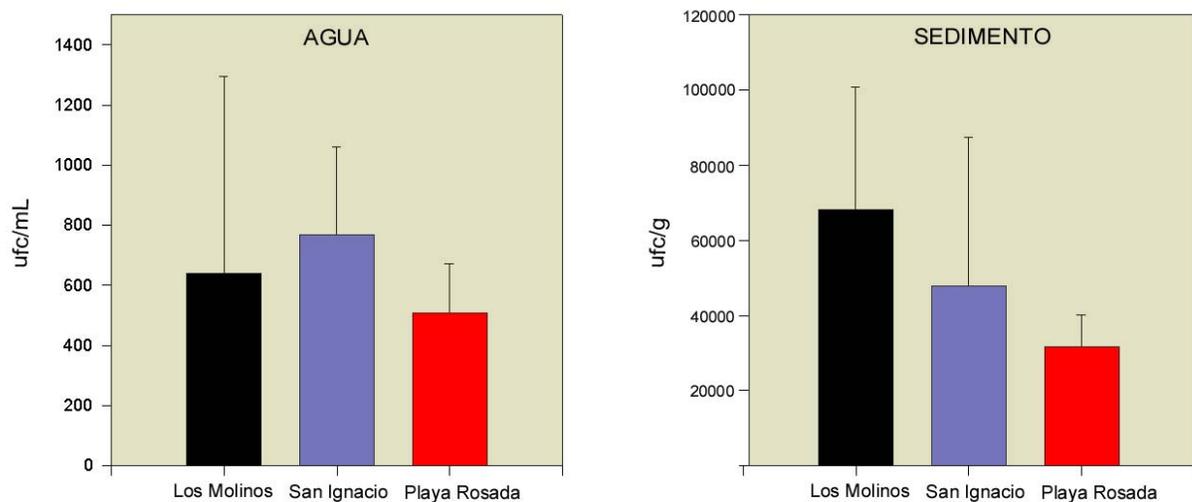


Figura 2. Recuentos viables de bacterias heterotróficas en agua y sedimento de los 3 sitios de muestreo de la costa de Valdivia

5.1.2 Identificación de bacterias heterotróficas

En la figura 3 se muestra la distribución porcentual de los géneros bacterianos encontrados en las muestras de agua de las 3 estaciones de muestreo. De las 71 cepas seleccionadas en la columna de agua, se observó un predominio de la flora bacteriana Gram negativa (88,7 %), encontrándose los microorganismos Gram positivos en un porcentaje mucho menor (5,6 %).

Los bacilos Gram negativos fermentadores predominaron en las muestras de agua, siendo el género *Vibrio* el dominante (54,9 %). Los bacilos Gram negativos no fermentadores representaron el 33,8 % de la flora bacteriana heterotrófica, siendo *Flavobacterium* el más importante.

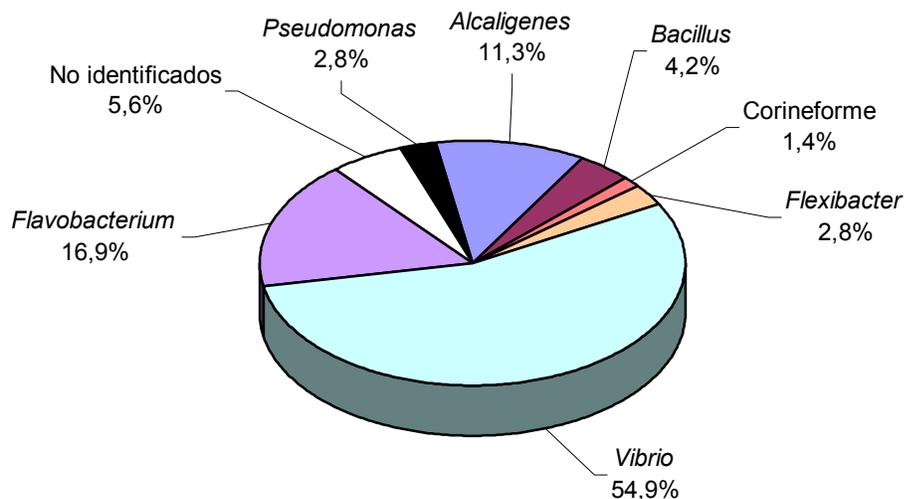


Figura 3. Distribución porcentual de bacterias heterotróficas viables en muestras de agua 3 sitios de muestreo de la costa de Valdivia

Los resultados de la identificación bacteriana de 73 cepas aisladas en las muestras de sedimento se muestran en la figura 4. Al igual que las muestras de agua, predominaron los Gram negativos con un 87,6 %. Sólo se aislaron 4 géneros bacterianos, siendo nuevamente *Vibrio* el mayoritario, con un 82,2 % seguido por el Gram positivo *Bacillus* con sólo un 5,5 %.

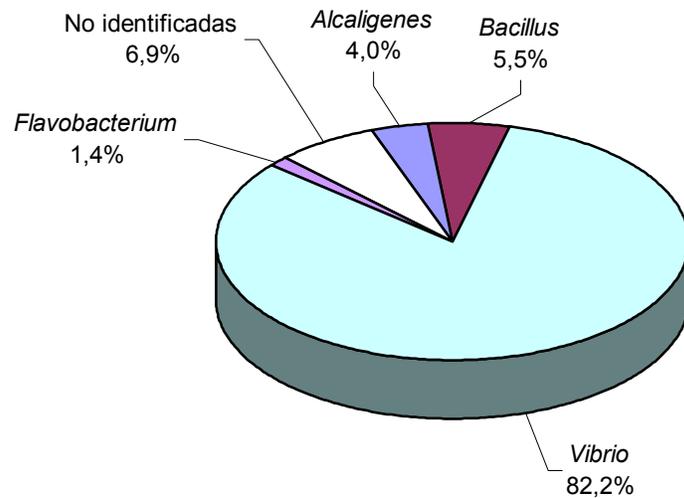


Figura 4. Distribución porcentual de bacterias heterotrófica viables en muestras de sedimentos en 3 sitios de muestreo de la costa de Valdivia.

5.1.3 Actividad antimicrobiana de cepas heterotróficas

Se ensayó la actividad antagonista de 144 cepas escogidas para su identificación. En la tabla 1 se resume el espectro de actividad de las cepas que presentaron antagonismo contra alguna de las cepas indicadoras. Sólo 5 cepas fueron positivas a los ensayos, destacando las cepas UACH 54.5 y UACH 54.10, que mostraron actividad contra *S. aureus* ATCC 25923.

Tabla 1. Actividad antimicrobiana de bacterias heterotróficas viables contra cepas de referencia.

Aislamiento	Tapiz indicador			
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
UACH 1.7	0	17	0	0
UACH 1.11	17	16	19	0
UACH 5.7	0	18	0	0
UACH 54.5	26	0	0	0
UACH 54.10	25	0	0	0

La sensibilidad de la cepa indicadora frente a la cepa marina se expresa como el diámetro del halo de inhibición (mm) alrededor de un disco de agar de 11 mm con la cepa viva después de una incubación a $20 \pm 1^\circ \text{C}$ por 16-18 h.

En la tabla 2 se muestra las características morfológicas y fisiológicas de las 5 cepas heterotróficas que demostraron actividad antimicrobiana. De acuerdo al perfil numérico de cada cepa, obtenido a través del sistema API 20 NE, los aislados UACH 1.11 y UACH 5.7 se identificaron como *Pseudomonas* sp, mientras que los restante aislados no se pudieron afiliar a ninguno de los géneros incluidos en la base de datos de este sistema de identificación.

Tabla 2. Caracterización morfológica y fisiológica de las 5 cepas bacterianas heterotróficas con actividad antimicrobiana.

	UACH 1.7	UACH 1.11	UACH 5.7	UACH 54.5	UACH 54.10
Gram	-	-	-	-	-
Morfología	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
Motilidad	+	+	+	+	+
Flagelación	Monopolar mónotrica	Monopolar mónotrica	Monopolar mónotrica	Monopolar mónotrica	Monopolar mónotrica
Catalasa	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	-	-
Color de colonia	Crema	Crema	Crema	Naranja	Naranja
O/F	O	O	O	-	-
Reducción de NO ₃	+	+	-	-	-
Reducción de NO ₃ a N ₂	+	+	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-
Arginina dihidrolasa	-	+	+	-	-
Ureasa	-	-	-	-	-
Hidrólisis de esculina	+	-	-	+	+
Hidrólisis de gelatina	-	+	+	+	+
β-galactosidasa	+	-	-	-	-
Asimilación de glucosa	-	+	+	-	-
Asimilación de arabinosa	-	+	+	-	-
Asimilación de manosa	-	+	+	-	-
Asimilación de manitol	+	+	+	-	-
Asimilación de N-acetil glucosamina	-	+	+	-	-
Asimilación de maltosa	+	-	-	-	-
Asimilación de gluconato	-	+	+	-	-
Asimilación de ácido cáprico	-	+	+	-	-
Asimilación de ácido adípico	-	-	+	-	-
Asimilación de ácido málico	+	+	+	-	-
Asimilación de citrato trisódico	-	+	+	-	-
Asimilación de ácido fenilacético	-	-	-	-	-

5.2 Bacterias oligotróficas viables

5.2.1 Recuentos bacterianos

Los recuentos de bacterias oligotróficas viables en el agua y sedimento en los tres sitios se presentan en la figura 5. Los números de bacterias en la columna de agua de San Ignacio fueron significativamente más altos que en las otras estaciones y fluctuaron entre 507 y 5.972 ufc/mL (promedio= 3.815 ufc/mL).

En los sedimentos, los recuentos promedios fluctuaron entre 46.333 ufc/g en San Ignacio y 75.600 ufc/g en Playa Rosada. Sin embargo, el análisis estadístico no reveló diferencias significativas en los promedios de los tres sitios de muestreo (anexo 1).

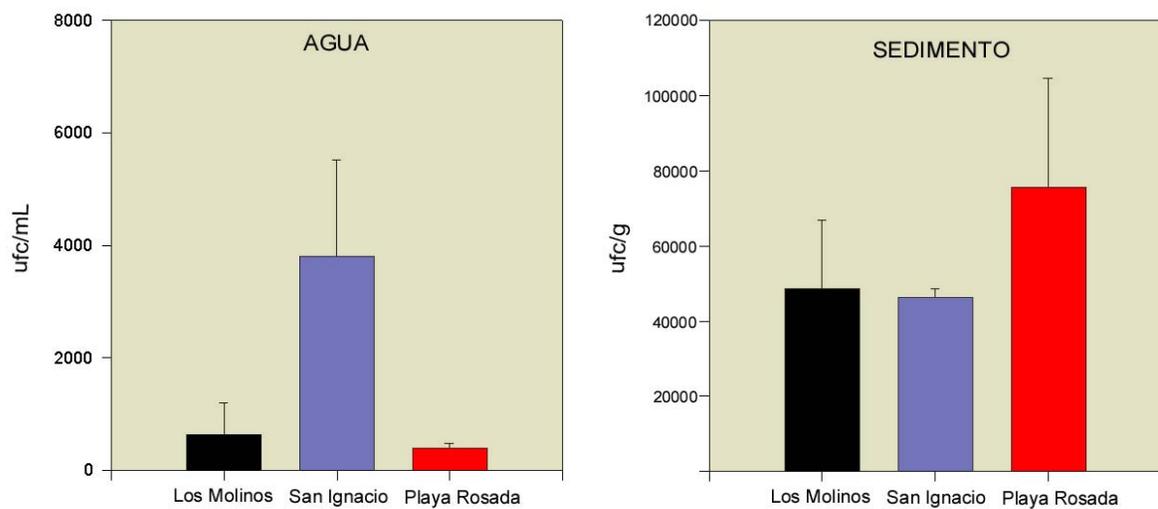


Figura 5. Recuentos viables de bacterias oligotróficas en agua y sedimento de los 3 sitios de muestreo de la costa de Valdivia.

5.2.2 Identificación de bacterias oligotróficas

En la figura 6 se presenta la distribución porcentual de los géneros hallados en las muestras de agua de las 3 estaciones de muestreo. De las 69 cepas seleccionadas en la columna de agua, se encontró un predominio de la flora bacteriana Gram negativa (89,8 %), mientras que los Gram positivos se hallaron en un 10,1 %.

Los bacilos Gram negativos fermentadores dominaron en el agua, siendo nuevamente *Vibrio* sp el mayoritario (53,6 %). En contraste, los Gram positivos estuvieron representados por *Bacillus* y corineformes, los que en conjunto representaron el 10,1 % del total de cepas identificadas.

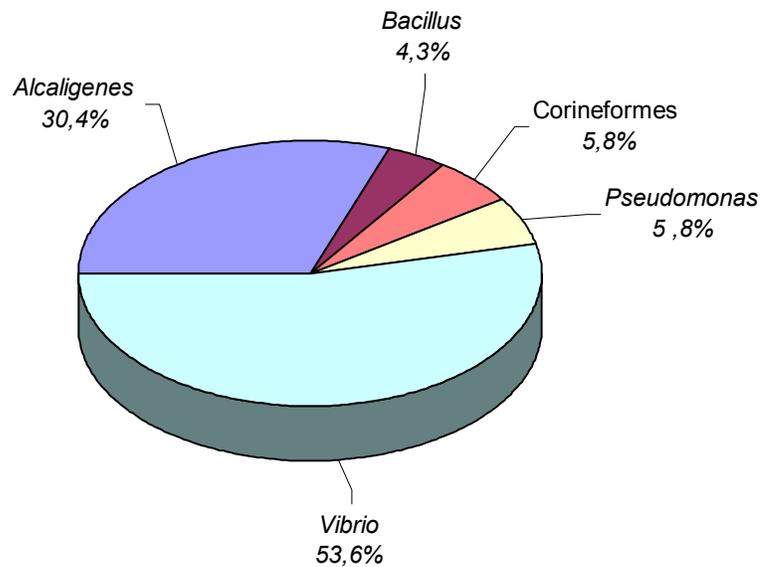


Figura 6. Distribución porcentual de bacterias oligotróficas viables en muestras de agua 3 sitios de muestreo de la costa de Valdivia

Las distribución de 77 cepas oligotróficas en las muestras de sedimento se muestra en la figura 7. También se observó una dominancia de Gram negativos, los que alcanzaron un 79,2 %. Los bacilos Gram negativos no fermentadores predominaron en el sedimento, siendo *Alcaligenes* sp el género más representativo con un 58,4 %. Dentro de los Gram positivos destacó *Bacillus* sp con un 9 %.

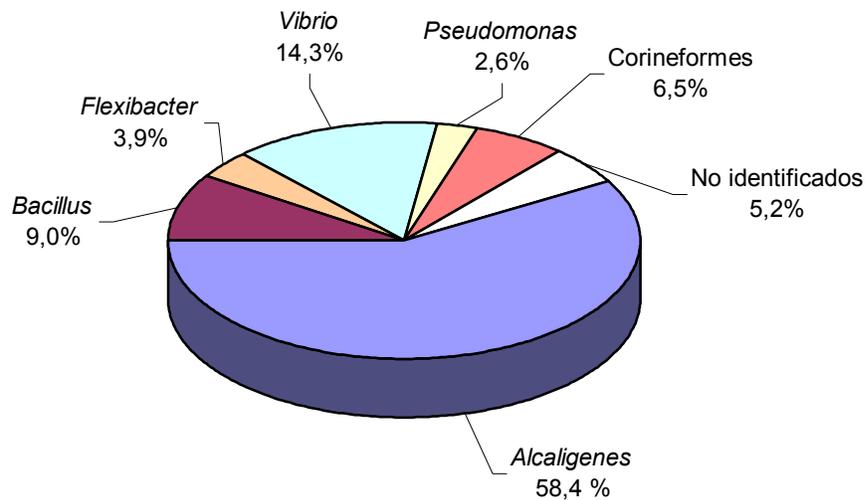


Figura 7. Distribución porcentual de bacterias oligotróficas en muestras de sedimentos de 3 sitios de muestreo de la costa de Valdivia.

5.2.3 Actividad antimicrobiana de cepas oligotróficas

Se ensayó la actividad antimicrobiana de 146 cepas escogidas para su identificación. Sólo las cepas UACH 26.5 y UACH 27.2 exhibieron antagonismo, el cual se dirigió contra *S. aureus* ATCC 25923 (fig. 8). La tabla 3 muestra el detalle de la actividad de ambos aislados.

Tabla 3. Actividad antimicrobiana de bacterias oligotróficas viables contra cepas de referencia.

Aislamiento	Tapiz indicador			
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
UACH 26.5	26	0	0	0
UACH 27.2	25	0	0	0

La sensibilidad de la cepa indicadora frente a la cepa marina se expresa como el diámetro del halo de inhibición (mm) alrededor de un disco de agar de 11 mm con la cepa viva después de una incubación a $20 \pm 1^\circ \text{C}$ por 16-18 h.

En la tabla 4 se presentan las principales características morfológicas y fisiológicas de ambas cepas.

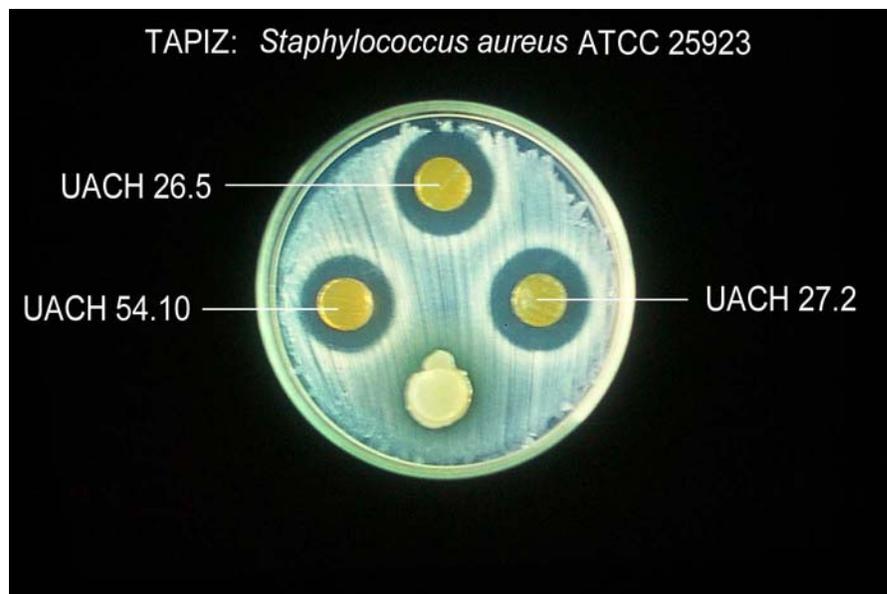


Figura 8. Actividad antimicrobiana de cepas bacterianas oligotróficas y heterotróficas sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Tabla 4. Características morfológicas y fisiológicas de las dos cepas oligotróficas con actividad antimicrobiana.

	UACH 26.5	UACH 27.2
Gram	-	-
Morfología	Bacilo	Bacilo
Motilidad	+	+
Flagelación	Monopolar mónotrica	Monopolar mónotrica
Color colonia	Naranja	Naranja
Catalasa	+	+
Oxidasa	-	-
O/F	-	-
Reducción de NO ₃	-	-
Reducción de NO ₃ a N ₂	-	-
Indol	-	-
Arginina dihidrolasa	-	-
Ureasa	-	-
Hidrólisis de esculina	+	+
Hidrólisis de gelatina	+	+
β-galactosidasa	-	-
Asimilación de glucosa	-	-
Asimilación de arabinosa	-	-
Asimilación de manosa	-	-
Asimilación de manitol	-	-
Asimilación de N-acetil glucosamina	-	-
Asimilación de maltosa	-	-
Asimilación de gluconato	-	-
Asimilación de ácido cáprico	-	-
Asimilación de ácido adípico	-	-
Asimilación de ácido málico	-	-
Asimilación de citrato trisódico	-	-
Asimilación de ácido fenilacético	-	-

De acuerdo al perfil numérico de los aislados, obtenido a través del sistema API 20 NE, los aislados UACH 26.5 y UACH 27.2 no se pudieron afiliar a ninguno de los géneros incluidos en la base de datos de este sistema.

5.3 Actinomycetes

5.3.1 Aislamiento de actinomycetes

El número de actinomycetes aislados sobre las placas de caseína-almidón fue bajo, lo que impidió obtener una estimación de su abundancia en las muestras analizadas. Se aisló un total de 45 cepas de actinomycetes, la mayoría desde Los Molinos. En la Tabla 5 los aislados se ordenan según su procedencia.

Tabla 5. Número de cepas de actinomycetes aislados de agua y sedimentos marinos de la costa de Valdivia

Procedencia	Cepas aisladas en agua	Cepas aisladas en sedimento	Total cepas aisladas
Los Molinos	11	14	25
San Ignacio	6	8	14
Playa Rosada	5	1	6

5.3.2 Identificación de los actinomycetes aislados

De las 45 cepas aisladas, 39 (86,7 %) pertenecieron al género *Streptomyces*. Para las restantes 6 cepas (13,33 %) está aún en estudio su filiación taxonómica. Las 39 cepas de *Streptomyces* se clasificaron de acuerdo al color de su micelio aéreo maduro (tabla 6). Las cepas

de la serie gris fueron las mayoritarias (41,03 %), aislándose principalmente desde Los Molinos, mientras que las menos representadas fueron las cepas de la serie amarilla (5,13 %).

Tabla 6. Distribución de los *Streptomyces* aislados según el color de su micelio aéreo maduro.

Sitios de muestreo	Color del micelio			
	(N° de cepas)			
	Amarillo	Blanca	Crema	Gris
Los Molinos	0	4	5	12
San Ignacio	2	3	4	3
Playa Rosada	0	1	4	1
Total	2	8	13	16

5.3.3 Actividad antimicrobiana de las cepas aisladas

De las 45 cepas de actinomycetes marinos aisladas, 31 (68,9 %) tuvieron actividad antimicrobiana. El análisis del espectro antimicrobiano proporciona información sobre los patrones de inhibición (Fig. 9). La actividad antagonica se dirigió principalmente contra *C. albicans*, la cual fue inhibida por el 61,3 % de las cepas positivas. En contraste, sólo 4 cepas (12,9 % del total de cepas positivas) presentaron actividad contra la bacteria Gram negativa *E. coli*.

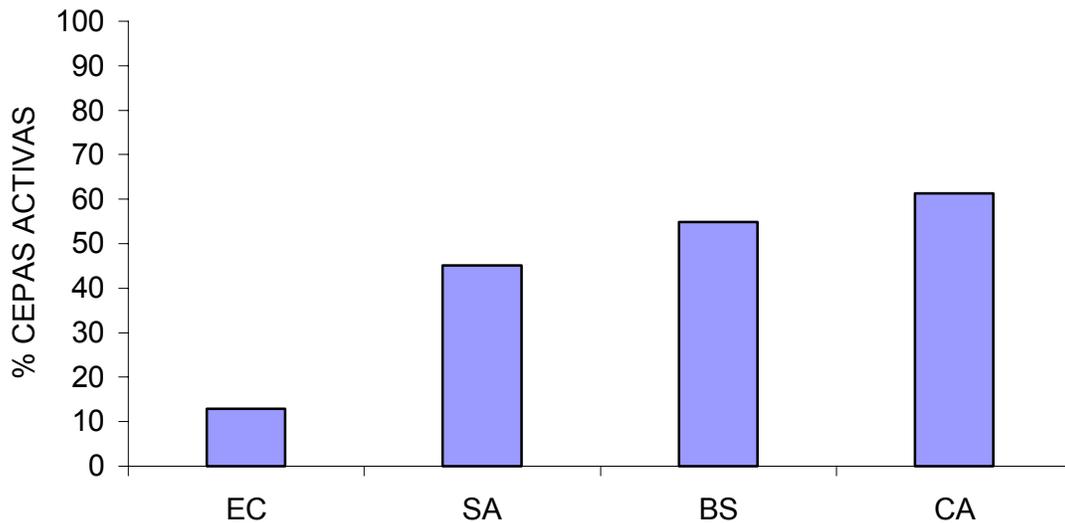


Figura 9. Especies bacterianas y fúngicas inhibidas por actinomicetes marinos.

EC, *Escherichia coli* ATCC 25922; SA, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; BS, *Bacillus subtilis* ATCC 6639; CA, *Candida albicans* ATCC 90029

El detalle de la actividad antimicrobiana de las 31 cepas de actinomicetes sobre las cuatro cepas de referencia se muestra en la tabla 7. Algunos aislados presentaron un espectro de inhibición amplio. Del total de cepas con actividad, 12 (38,7 %) presentaron antagonismo sobre ambos Gram positivos. Las 4 cepas que inhibieron a *E. coli* también lo hicieron contra uno o ambos Gram positivos de referencia. Asimismo, 7 cepas (22,6 % del total de cepas positivas) inhibieron simultáneamente a Gram positivos y *C. albicans*. En contraste, la cepa UACH 24 (*Streptomyces* sp) fue la única que exhibió actividad contra todas las cepas indicadoras.

En las figura 10 y 11 se muestran fotografías de algunos ensayos de antibiogramas usando cepas de actinomicetes marinos contra cepas bacterianas y fúngicas de referencia.

Tabla 7. Actividad antimicrobiana de 31 actinomycetes marinos contra cepas de referencia.

	Cepa	Tapiz indicador			
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
1	UACH 005	0	0	0	19
2	UACH 008	0	0	0	21
3	UACH 009	0	20	19	27
4	UACH 010	0	16	13	0
5	UACH 011	13	0	15	0
6	UACH 014	0	16	21	14
7	UACH 015	0	0	18	0
8	UACH 016	0	0	0	20
9	UACH 017	0	19	24	0
10	UACH 019	0	0	0	20
11	UACH 020	0	0	0	21
12	UACH 021	0	11	11	0
13	UACH 022	0	0	0	17
14	UACH 024	21	32	24	14
15	UACH 025	0	0	0	22
16	UACH 026	0	0	0	16
17	UACH 027	0	0	0	20
18	UACH 029	12	14	0	0
19	UACH 033	12	12	17	0
20	UACH 034	0	0	13	0
21	UACH 035	0	12	0	17
22	UACH 037	0	0	21	0
23	UACH 038	0	16	14	16
24	UACH 041	0	21	22	0
25	UACH 042	0	0	26	0
26	UACH 043	0	0	0	20
27	UACH 044	0	28	20	0
28	UACH 045	0	16	15	41
29	UACH 046	0	0	0	21
30	UACH 047	0	0	0	20
31	UACH 052	0	25	17	12

La sensibilidad de la cepa indicadora frente a la cepa marina se expresa como el diámetro del halo de inhibición (mm) alrededor de un disco de agar de 11 mm con la cepa viva después de una incubación a $20 \pm 1^\circ \text{C}$ por 16-18 h.

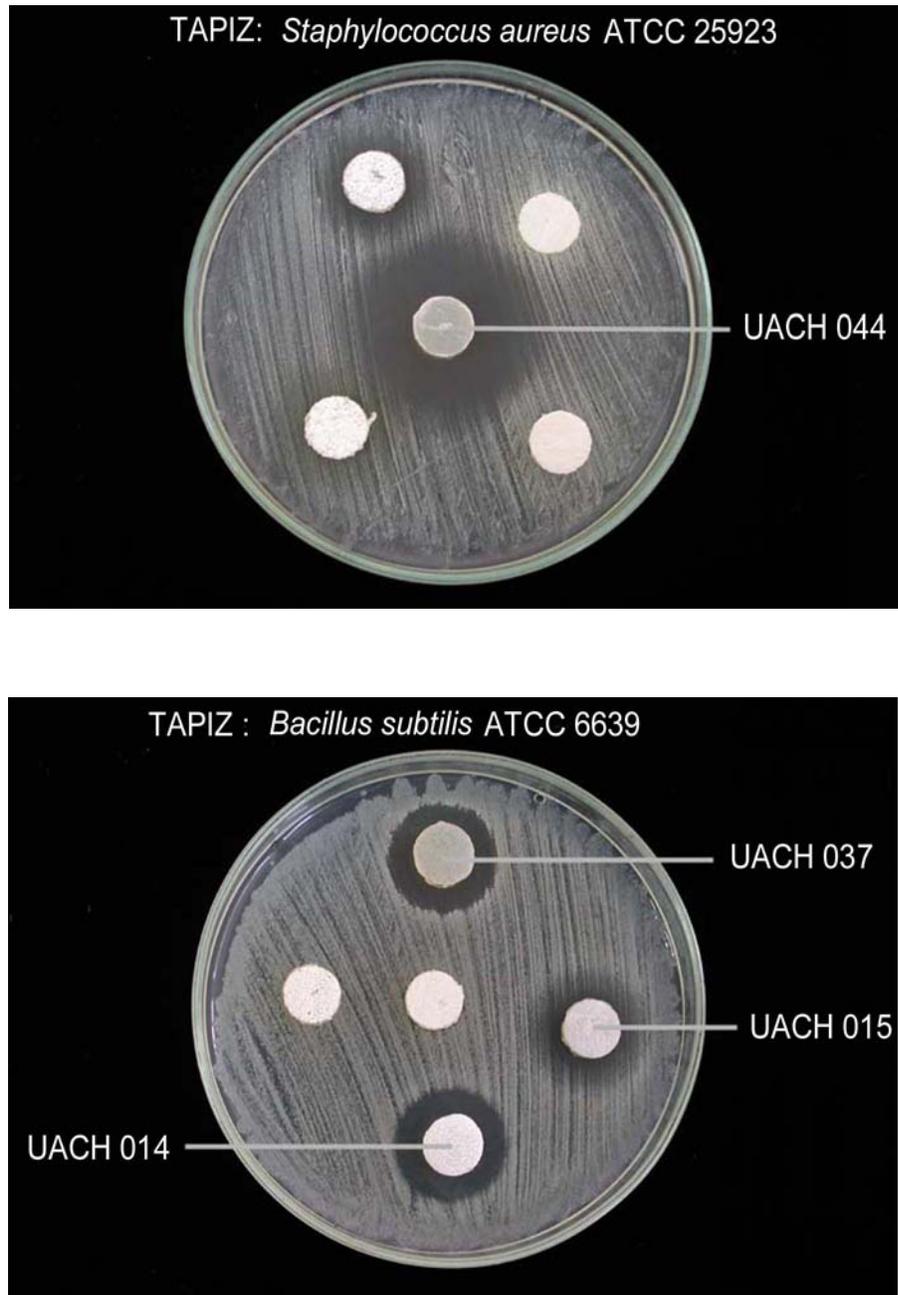


Figura 10. Actividad antimicrobiana de cepas de actinomicetes marinos sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Bacillus subtilis* ATCC 6639.



Figura 11. Actividad antimicrobiana de cepas de actinomicetes marinos sobre *Candida albicans* ATCC 90029.

6. DISCUSION

Se considera que una condición que deben tener los futuros programas de 'screening' es la búsqueda de nuevos metabolitos con potencial farmacológico en ambientes no explorados con anterioridad (Nolan & Cross, 1988). Hasta ahora la búsqueda de especies de microorganismos productores de nuevas moléculas bioactivas se ha enfocado en los ambientes terrestres, siendo los actinomicetes y microhongos los más antagónicos. Sin embargo, hoy en día se considera que el ambiente marino también constituye un importante recurso para la obtención de nuevos productos naturales para el tratamiento de enfermedades infecciosas (Fenical, 1993; Jensen & Fenical, 1994; Sponga et al., 1999; Donia & Hamann, 2003).

Los océanos del mundo cubren casi dos tercios de la superficie terrestre y se considera que posee la mayor riqueza filogenética, con 34 de los 36 phyla representados y más de 300.000 especies de plantas y animales descritos (Donia & Hamann, 2003). En este sentido, es imperativo explorar más intensamente el hábitat marino y su biota, para asegurar un flujo continuo de metabolitos que sean candidatos a nuevas drogas. En efecto, los organismos marinos han desarrollado capacidades metabólicas y fisiológicas únicas, diferentes a las de sus contrapartes terrestres, las cuales estarían destinadas a facilitar la supervivencia en el ambiente marino, un concepto apoyado por numerosas publicaciones que describen las interacciones intra e interespecíficas. Factores como competencia por espacio y nutrientes, adhesión a superficies sumergidas (fouling) y predación, constituyen presiones selectivas que han llevado a la evolución de moléculas únicas, distintas a las producidas por organismos terrestres en estructura y actividad biológica (Fenical, 1993; Engel et al., 2002; Donia & Hamann, 2003).

La bioprospección del ambiente marino ha llevado al descubrimiento de más de 12.000 compuestos nuevos y este número aumenta rápidamente (Donia & Hamann, 2003). Según Donia & Hamann (2003) varios de estos productos marinos ya han sido desarrollados exitosamente por la industria farmacéutica y el rango de propiedades farmacológicas incluye agentes antifúngicos, antihelmínticos, antiprotozoarios, antibacterianos, antituberculosis y antivirales.

Tradicionalmente los programas de “screening” han privilegiado el aislamiento de actinomycetes, debido a su conocida capacidad productora de sustancias antimicrobianas. Sin embargo, es conveniente considerar otros microorganismos en los cuales también se ha encontrado producción de metabolitos bioactivos, como otros grupos bacterianos y microhongos (Gauthier & Flatau, 1976; Girones et al., 1989; Christophersen et al., 1999; Cueto et al., 2001; Henstchel, 2001). En este sentido, en el presente trabajo se utilizaron dos medios de cultivo, agar marino 2216 y un medio con baja concentración en nutrientes, para el aislamiento de bacterias viables heterotróficas y oligotróficas, respectivamente, para posteriormente ensayar su actividad biológica.

Los recuentos promedios de bacterias heterotróficas fluctuaron entre 509 ufc/mL y 766 ufc/mL, en Playa Rosada y San Ignacio, respectivamente. Estos números son similares a lo encontrados por Schadebrodt (1983), quien en un estudio orientado a evaluar la calidad bacteriológica de agua de la Bahía de Corral obtuvo recuentos de bacterias heterotróficas entre 501 y 1.000 ufc/mL.

Es necesario señalar que los recuentos en placa de bacterias marinas subestiman apreciablemente el número de bacterias presentes en el agua. En efecto, se cree que no más de un 1 % de los microorganismos viables en el agua son capaces de formar colonias visibles en medios de agar (Fenical, 1993; Kaeberlein et al., 2002; Zengler et al., 2002). Este sesgo es inherente al cultivo de microorganismos, ya que los actuales medios de cultivo presentan condiciones extremadamente artificiales y no realistas, como lo son una alta concentración de nutrientes (éstos se encuentran en bajas cantidades en el agua de mar) y la carencia de nutrientes específicos requeridos para el crecimiento (Zengler et al., 2002). Al respecto, se ha demostrado recientemente que algunos microorganismos que no crecen en los medios de cultivo tradicionales, si lo hacen en cultivo puro, si al medio se añaden nutrientes específicos presentes en su hábitat (Kaeberlein et al., 2002).

La microbiota bacteriana heterotrófica y oligotrófica predominante en el agua y sedimento consistió de bacterias Gram negativas, con una participación superior al 70 %. En contraste, el mayor porcentaje de bacterias Gram positivas no superó el 16 %. Estos resultados coinciden con lo descrito por Rheinheimer (1987), quién señala que la mayoría de las bacterias marinas son Gram negativas, con proporciones incluso mayores al 90 %. Similares resultados también son reportados por Schadebrodt (1983), quien informó que en los sectores de El Canelo, Las Balizas y Las Coloradas de Corral, los porcentajes de bacterias Gram negativas son: 77,7 %, 71 %, 74 %, respectivamente.

En el presente trabajo, los géneros de bacterias Gram negativas más frecuentes fueron *Vibrio* y *Alcaligenes*. Estos géneros también han sido observados como predominantes por otros

autores en ambientes marinos. Schadebrodt (1983) observó un predominio de los géneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Vibrio* en la Bahía de Corral. A su vez, Macdonell & Hood (1982), en un trabajo realizado en Perdido Bay, Alabama, halló en mayor cuantía a los géneros *Pseudomonas* y *Vibrio*.

Entre los Gram positivos, el género predominante fue *Bacillus* que alcanzó su mayor número en las bacterias oligótroficas de sedimento (9 %). Estos resultados están de acuerdo con lo expresado por Rheinheimer (1987), quien señala que los microorganismos esporulados son más frecuentes en los sedimentos, no estando bien difundidos en el agua de mar.

De 290 cepas de bacterias heterotróficas y oligotróficas ensayadas, 7 mostraron actividad antagónica contra alguna de las cepas indicadoras, dirigida principalmente contra *S. aureus*. Si bien la proporción de cepas activas puede parecer bajo, permite reafirmar la idea de que es necesario incluir en futuros programas de 'screening' no sólo actinomicetes, sino también otros grupos bacterianos. En esta línea, el hallazgo de actividad antagónica en bacterias marinas no actinomycetales ha sido reportada extensamente. Fudou et al. (2001) aislaron la mixobacteria *Haliangium luteum* la cual producía un nuevo antibiótico poliinsaturado denominado haliangicina, el cual presentó una fuerte actividad contra hongos filamentosos como *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus*, comparable a antibióticos polienos como amfotericina B y nistatina. Gauthier & Flatau (1976), descubrieron que la bacteria marina pigmentada *Alteromonas luteoviolaceus*, producía 2 tipos de sustancias antimicrobianas, un polisacárido ácido difusible y una sustancia intracelular bromada las cuales exhibieron actividad antibiótica en contra de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Bacillus firmus*. Otro hallazgo significativo

es el realizado por Nagao et al. (2001) quienes encontraron que una bacteria marina del género *Bacillus*, aislada desde el alga *Schizymenia dubyi*, producían antibioticos macrolactinas, las cuales tienen efecto inhibitorio contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, además de actividad citotóxica y antiviral. Por su parte Hentschel et al. (2001), aislaron desde la esponja *Aplysina cavernicola* cepas bacterianas de los géneros *Bacillus*, *Micrococcus* y *Vibrio*, las cuales poseían actividad antimicrobiana en contra de las especies *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* multirresistentes

Los actinomicetes se han aislado desde hábitats muy diversos, incluyendo suelos (Díaz Corrales et al., 1997; Saadoun & Al-Momani, 2000), agua (Cross, 1981; Barcina et al., 1987; Saadoun et al., 1999; Zaitlin et al., 2003), sedimentos (Barcina et al., 1987; Ellaiah & Reddy, 1987) e invertebrados acuáticos (Mathew et al, 1994; Trischman et al., 1994). Históricamente, la pesquisa de actinomicetes y sus metabolitos secundarios se ha realizado principalmente en suelos, abarcando diferentes tipos de suelos, prácticamente rastrellándose este ambiente en diferentes latitudes (Xu et al., 1996; Díaz Corrales et al., 1997; Saadoun & Al-Momani, 2000; Lee & Hwang, 2002). Los estudios realizados en Chile hablan de su búsqueda en muestras de suelo del extremo Sur-Austral, aislándose numerosas cepas con actividad antibacteriana y antifúngica (García-Quintana et al., 1997.) Si bien los actinomicetes del suelo siguen constituyendo una fuente de nuevos metabolitos de interés farmacológico, la disminución en la tasa de descubrimiento de nuevas moléculas ha llevado a reorientar la búsqueda hacia otros ambientes. En este sentido, la pesquisa de actinomicetes en ambientes acuáticos ha deparado el hallazgo de metabolitos con estructuras únicas y posibles de ser usados en el área terapéutica.

Si bien son los estudios en ambientes de agua dulce los que han suministrado el mayor volumen de información sobre la distribución de los actinomicetes en los sistemas acuáticos (Cross, 1981; Zaitlin et al., 2003), en los últimos años se ha avanzado bastante en la comprensión de la ecología de los actinomicetes en los ambientes marinos.

Aunque el medio caseína-almidón ha sido ampliamente utilizado para el aislamiento de actinomicetes desde diferentes tipos de muestras, tanto de ambientes terrestres como acuáticos, en el presente estudio el número de actinomicetes aislados sobre este medio de cultivo fue bajo. Esto podría deberse a que este medio incluye como fuente de carbono almidón o glicerol, los cuales no son nutrientes representativos de los utilizados por los microorganismos en el medio marino. Futuros estudios sobre actinomicetes podrían considerar por ejemplo el uso de quitina como fuente de carbono, ya que varios estudios demuestran un aumento en la recuperación de actinomicetes desde muestras marinas cuando se incluye este compuesto en los medios de aislamiento (Pisano et al., 1986, 1992).

El bajo número de actinomicetes aislados no permitió conocer su abundancia en las muestras analizadas (expresada como ufc/g o ufc/mL) y de paso averiguar la proporción de la población de actinomicetes en relación a la población microbiana viable total. Takizawa et al. (1993), estudiando la distribución de actinomicetes en la Bahía de Chesapeake en Estados Unidos, reportaron que la proporción de actinomicetes en la población microbiana total fluctuaba entre 0,36 y 8,63 %. Similares proporciones fueron encontradas por Barakate et al. (2002) en suelos de Marruecos (0,5 - 8,70 %).

En el presente estudio, se observó un predominio de *Streptomyces* spp, lo que es consistente con lo informado en la literatura. Ellaiah & Reddy (1987), en un estudio realizado en las costas de la India en sedimentos marinos, encontraron un predominio de *Streptomyces* (72,8 %) y *Micromonospora* (15 %). Barcina et al. (1987) partir de muestras de agua y sedimento marinos colectadas en España, también observaron un predominio de *Streptomyces*. Asimismo, numerosos estudios demuestran que géneros como *Streptomyces* también predominan en diversos tipos de suelo (Xu et al., 1996; Díaz Corrales et al., 1997; Barakate et al., 2002; Lee & Hwang, 2002; Saadoun & Gharaibeh, 2002).

Los resultados de la caracterización de los *Streptomyces* según el color de su micelio aéreo maduro muestran un predominio de los aislados de la serie gris (41,03 %), los cuales se aislaron mayoritariamente desde Los Molinos, mientras que los menos representados fueron las cepas de la serie amarilla (5,13 %). Diversos autores han demostrado que los *Streptomyces* de la serie gris son los más comunes, tanto en suelos como en hábitat marinos. Saadoun et al. (1999), analizaron la morfología y actividad antimicrobiana de *Streptomyces* aislados desde estanques de acuicultura y observaron un predominio de representantes de la serie gris, seguidos por aislados de la serie amarilla. En ambientes terrestres Saadoun & Gharaibeh (2002), al estudiar los *Streptomyces* aislados desde suelos de Jordania, informaron que de 292 aislados, 101 (35 %) correspondían a representantes de la serie gris, seguidos por los de la serie blanca (30 %). Similares resultados fueron obtenidos por Barakate et al. (2002), quienes observaron en la rizósfera de suelos de Marruecos el dominio de los aislados de la serie gris (40 %), siendo los menos representados los de la serie roja (2 %).

En este estudio, de 45 cepas de actinomicetes aisladas- mayoritariamente *Streptomyces*- 31 fueron antagónicas, dirigiéndose la actividad principalmente hacia *B. subtilis* y *C. albicans*. Mas aún, algunas cepas exhibieron un espectro de inhibición más amplio, presentando actividad contra *S. aureus* y *B. subtilis* (e.g. cepas UACH 010, UACH 017 y UACH 041), Gram negativos y Gram positivos (e.g. cepas UACH 29 y UACH 33), contra Gram positivos y *Candida albicans* (e.g. cepas UACH 009, UACH 014 y UACH 45) e incluso contra todas las cepas indicadoras (cepa UACH 24). Estos resultados son promisorios e indican el potencial de los actinomicetes marinos como una rica fuente de nuevos compuestos antimicrobianos.

Indudablemente, el resultado más destacable del presente estudio es la notoria actividad de los actinomicetes marinos contra *C. albicans*. En efecto, la mayoría de los trabajos revisados sobre antibiosis en actinomicetes marinos, describen actividad principalmente contra Gram positivos como *S. aureus* o *B. subtilis*. No obstante, la mayoría de los estudios también describen una baja actividad contra Gram negativos. Pisano et al (1989), reportaron que un 46 % de los actinomicetes aislados desde sedimentos marinos exhibían actividad antimicrobiana, principalmente contra Gram positivos, siendo *B. subtilis* el más sensible, mientras que sólo el 5 % de los aislados inhibieron a *E. coli*. Barcina et al. (1987) informaron que el 47 % de los *Streptomyces* marinos presentaron actividad contra *B. subtilis* y sólo un 8 % contra *E.coli*. A su vez, Pisano et al. (1992) encontraron que el 58 % de los actinomicetes aislados desde sedimentos marinos presentaban actividad contra *B. subtilis*, un 50 % contra *S. aureus* y sólo un 11 % contra *E. coli*.

La actividad antifúngica de actinomicetes marinos fue reportada por Pisano et al. (1992) quienes hallaron que *Candida krusei* era susceptible al 49 % de los aislamientos marinos, mientras que *C. albicans* era inhibida por el 32 %. Estos autores también informaron antagonismo contra los hongos filamentosos *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* y *Fusarium moniliforme*, atribuyendo la actividad antifúngica principalmente a antibióticos polienos, como heptaenos.

Actividad contra Gram negativos fue informada por Angulo et al. (1987) y Ellaiah & Reddy (1987). Angulo et al. (1987), analizaron la actividad antimicrobiana de actinomicetes marinos contra 15 cepas de Gram negativos patógenos de peces y moluscos y encontraron que el 60 % de los aislados inhibían al menos a uno de las cepas indicadoras. La actividad se dirigió principalmente contra *Yersinia ruckery*, *Vibrio anguillarum* y *Aeromonas hydrophila*. Por su parte, Ellaiah & Reddy (1987) encontraron que de 19 cepas de *Streptomyces* activas aisladas desde sedimentos marinos, el 47,4 % inhibía a *E. coli*. Estos autores también reportaron actividad contra los hongos *A. niger* (36,8 %) y *C. albicans* (26,3 %).

Si bien los ensayos de antibiosis usando cepas vivas constituyen la aproximación inicial en los programas de 'screening', es fundamental en la búsqueda de nuevos metabolitos el ensayo rápido de extractos bacterianos y el posterior análisis estructural de la molécula a través de metodología NMR. Estos estudios han revelado una enorme cantidad de moléculas bioactivas estructuralmente nuevas a partir de actinomicetes marinos (Pathirana et al., 1991; Fenical, 1993; Ford et al., 1998; Capon et al., 2000; Yamada et al., 2002). Yamada et al. (2002) descubrieron un nuevo macrólido denominado halichoblelida, el cual presentó una fuerte actividad antitumoral

contra la línea celular murina P388 y 39 líneas celulares cancerígenas humanas. Esta nueva molécula se aisló desde una cepa de *Streptomyces hygroscopicus*, que a la vez fue aislada desde el pez marino *Halichoeres bleekeri*. Capon et al. (2000) aislaron dos nuevas amidas aromáticas denominadas lorneamidas A y B, las cuales se aislaron desde un cultivo de un actinomicete marino obtenido desde las costas de Australia. Las lorneamidas son moléculas con esqueletos carbonados no descritos antes en la literatura. Lorneamida A exhibió actividad contra *B. subtilis* con una LD₉₉ de 50 µg/mL. Biabani et al. (1997) aislaron desde un aislado de *Streptomyces* marino un nuevo metabolito del tipo pluramicina llamado δ-indomycinona, el cual mostró un MIC de 113 µg/mL contra *B. subtilis*. Por su parte, Pathirana et al. (1991), encontraron a partir de una cepa de un actinomicete marino un nuevo glicósido macrólido al que denominaron maduralida, el que mostró actividad antibiótica contra *B. subtilis*. Un interesante hallazgo fue reportado por Tapiolas et al. (1991), quienes, a partir de un *Streptomyces* aislado desde la superficie del coral gorgoniano *Pacifigorgia* sp, aislaron dos nuevos agentes citotóxicos, octalactinas A y B, presentando el primero actividad citotóxica *in vitro* contra líneas celulares cancerígenas humanas y murinas.

Si bien el medio caseína-almidón es muy utilizado para el aislamiento de actinomicetes, una de sus limitantes es que favorece el crecimiento de algunos géneros, principalmente *Streptomyces*. Este efecto también se observó en la presente investigación, donde más del 85 % de las cepas aisladas sobre el agar caseína-almidón fueron *Streptomyces* spp. Sin embargo, el descubrimiento de antibióticos desde nuevas especies de actinomicetes no pertenecientes al género *Streptomyces*, hace necesario reorientar la búsqueda hacia el aislamiento de nuevos géneros o especies productoras. En este sentido, para maximizar el aislamiento de los

denominados ‘géneros raros’, se emplean métodos de aislamiento selectivos orientados a géneros. Este es un enfoque no exento de problemas, ya que implica el desarrollo de medios de cultivo especializados, empleo de pretratamientos en las muestras, tiempos de incubación más prolongados, así como el uso de antibacterianos, que inhiban el crecimiento de bacterias competidoras, incluyendo otros actinomicetes (Nolan & Cross, 1988). Esta aproximación ha renovado la pesquisa de antimicrobianos y ha significado el descubrimiento de nuevas especies y géneros de actinomicetes, así como de nuevos compuestos de importancia farmacológica. Ejemplo de ello es el género *Actinoplanes*, desde el cual se han obtenido más de 120 antibióticos, como por ejemplo la purpuromicina producida por *A. ianthinogenes* ATCC 21884 y lipiarmicina obtenida desde *A. deccanensis* ATCC 21938 (Lazzarini et al., 2000).

Finalmente, se acepta la hipótesis que en el agua y sedimentos marinos de la costa de Valdivia, algunos aislados de la población bacteriana cultivable presentan actividad antagónica sobre bacterias y hongos de referencia.

7. CONCLUSIONES

- La población bacteriana heterotrófica y oligotrófica viable en el agua y sedimento de la costa de Valdivia consistió mayoritariamente de bacterias Gram negativas, siendo los principales géneros *Vibrio* y *Alcaligenes*.

- La población de actinomicetes está formada principalmente por *Streptomyces* sp. de la serie gris.

- El bajo número de cepas de actinomicetes obtenidos señala la necesidad de utilizar, además del medio caseína- almidón, otros medios selectivos y/o pretratamientos, a fin de aumentar el número y diversidad de los actinomicetes aislados

- El 68,9 % de los actinomicetes presentaron actividad antimicrobiana, la cual se dirigió principalmente contra la levadura *C. albicans*.

- Finalmente, la hipótesis de trabajo se acepta.

ANEXOS

Recuentos promedios de bacterias heterotróficas y oligotróficas viables en muestras de agua y sedimentos de tres sitios de muestreo de la costa de Valdivia.

			Los Molinos	San Ignacio	Playa Rosada
Bacterias heterotróficas en columna de agua (ufc /mL)			639	766	509
Bacterias heterotróficas en sedimentos (ufc/g)			68.277	47.966	39.400
Bacterias oligotróficas en columna de agua (ufc /mL)			644	3.815 *	396
Bacterias oligotróficas en sedimentos (ufc/g)			48.666	46.333	75.600

* Indica una diferencia significativa entre estaciones ($\alpha = 0,05$)

REFERENCIAS

Angulo, L., Andrés, M. C. & Graña, F. (1987) Aislamiento e identificación de un *Streptomyces* marino con actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas de peces y moluscos aisladas a partir del medio marino y de aguas dulces. *Thalassas* 5, 97-101.

Barakate, M., Ouhdouch, Y., Oufdou, K. H. & Beaulieu, C. (2002) Characterization of rhizospheric soil streptomycetes from Moroccan habitats and their antimicrobial activities. *World. J. Microbiol.& Biotechnol.* 18, 49-54

Barcina, I., Iriberry, J. & Egea, L. (1987) Enumeration, isolation and some physiological properties of Actinomycetes from sea water and sediment. *System. Appl. Microbiol.* 10, 85-91.

Biabani, M. A. F; Laatsch, H; Helmke, E. & Weyland, H. (1997) δ -Indomycinone: a new member of pluramycin class of antibiotics isolated from marine *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.* 50, 874–877.

Capon, R. J., Skene, C., Lacey, E., Gill, J. H., Wicker, J., Heiland, K. & Friedel, T. (2000) Lorneamides A and B: two new aromatic amides from a southern Australian marine actinomycetes. *J. Nat. Prod.* 63, 1682-1683.

Christophersen, C., Crescente, O., Frisvad, J. C., Gram, L., Nielsen, J., Nielsen, H.N. & Rahbaek, L. (1999) Antibacterial activity of marine-derived fungi. *Mycopatologia* 143, 135- 138.

Cragg, G.M. & Newman, D. J. (2001) Medicinals for the millennia - The historical record. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 953, 3-25.

Cross, T. (1981) Aquatic Actinomycetes: A critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats. *J. Appl. Bacteriol.* 50, 397-423.

Cueto, M., Jensen, P.R., Kauffman, C., Fenical, W., Lobkovsky, E. & Clardy, J. (2001) Pestalone, a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge. *J. Nat. Prod.* 64, 1144-1446.

Díaz Corrales, F. J, García, E. & Serrano, J. A. (1997). Identificación y producción de antibiosis por Actinomycetales aislados del suelo. *Boletín SYM* 17, 13-18.

Donia, M. & Hamann, M.T. (2003) Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *Lancet. Infect. Dis.* 3 ,338-348

Ellaiah, P. & Reddy, A.P.C. (1987) Isolation of actinomycete from marine sediment off Visakhapatnam, east coast of India. *Ind. J. Mar. Scie.* 16,134-135.

Engel, S., Jensen P. R. & Fenical, W. (2002) Chemical ecology of marine microbial defense. *J. Chem. Ecol.*, 28, 1971-1985.

Fenical, W. (1993) Chemical studies of marine bacteria: Developing a new resource. *Chem. Rev.*, 93, 1673-1683.

Ford, P. W., Gadepalli, M. & Davidson, B. S. (1998). Halawanones A – D. new polycyclic quinones from a marine-derived streptomycete. *J. Nat. Prod.* 61, 1232-1236.

Fudou, R., Iizuka, T., Sato, A., Ando, T., Shimba, N. & Yamanaka S. (2001) Haliangicin, a novel antifungal metabolite produced by a marine myxobacterium. Isolation and structural elucidation. *J. Antibiot.* 54, 153-156.

García-Quintana, H. G., Zaror, L. & Leiva, S. (1997) Efecto antibiótico de cepas silvestres de *Streptomyces* aisladas de suelos chilenos. *Rev. Méd. Chile* 12, 1157-1164.

Gauthier, M.J. & Flatau, G.N. (1976) Antibacterial activity of marine violet-pigmented *Alteromonas* with special reference to the production of brominated compounds. *Can. J. Microbiol.* 22, 1612-1619.

Girones, R., Jofre J.T. & Bosch, A. (1989) Isolation of marine bacteria with antiviral properties. *Can. J. Microbiol.* 35, 1015-1021.

Hentschel, U., Schmid, M., Wagner, M., Fieseler, L., Gernert, C. & Hacker, J. (2001) Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35, 305-312.

Hernández, M. L., Pla, J. & Nombela, C. (1997) Aspectos moleculares y genéticos de la resistencia a azoles en *Candida albicans*. *Rev. Iberoam. Micol.* 14, 150-154.

Heyduck-Söllner, B. & Fisher, U. (2000) Extracellular cyanobacterial substances inhibit microbial growth. *Internatl. Microbiol.* 3, 231-234.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. & Williams S. T. (1994) *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th edition. Williams & Wilkins, Baltimore. 787 p.

Jensen, P. R. & Fenical, W. (1994) Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: Ecological perspectives. *Ann. Rev. Microbiol.* 48, 559-584.

Kaeberlein, T., Lewis, K. & Epstein, S.S. (2002) Isolation Uncultivable microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* 296, 1127-1129

Küster, E. & Williams, S. T. (1964) Selection of media for isolation of Streptomycetes. *Nature*, 202, 928-929.

Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G. & Marinelli, F. (2000) Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek* 78, 399-405.

Lee, J.Y. & Hwang, B.K. (2002) Diversity of actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can. J. of Microbiol.*, 48,407-417.

Leiva, S., García-Quintana, H. & Zaror, L. (2000) Actinomycetes acuáticos: una revisión sobre su aislamiento, distribución y potencial antibiótico. *Medio Ambiente.*, 13, 80-88

Macdonell, M.T. & Hood, M..A. (1982) Isolation and characterization of ultramicrobacteria from a Gulf Coast Estuary. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 566-571.

Mathew, A., Dhevendaran, K., Georgekutty, M. J. & Natarajan, P. (1994) L-Asparaginase activity in antagonistic streptomycetes associated with clam *Villorita cyprinoids* (Hanley). *Ind. J. Mar. Sci.* 23, 204-208.

Nagao, T., Adachi, K., Sakai, M., Nishijima, M. & Sano, H. (2001) Novel macrolactins as antibiotic from a marine bacterium. *J. Antibiot.* 54, 333-339.

Nolan R.D, Cross T. (1988) Isolation and screening of actinomycetes. In: Goodfellow M, Williams ST, Mordarsky M, ed. *Actinomycetes en biotechnology*. San Diego, Calif.: Academic Press Inc: 1-32.

Pathirana, C., Tapiolas, D., Jensen, P. R., Dwight, R. & Fenical, W. (1991) Structure determination of maduralide: a new 24-membered ring macrolide glycoside produced by a marine bacterium (Actinomycetales). *Tetrahedron Lett.* 32, 2323-2326.

Pettit, G.R., Herald,C.L., Doubek, D.L. & Herald, D.L. (1982) Isolation and structure of bryostatin 1. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 6848-6849.

Pisano, M. A., Sommer, M. J. & López, M. M. (1986) Application of pretreatments for the isolation of bioactive actinomycetes from marine sediments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 25, 285-288.

Pisano, M. A., Sommer, M. J. & Brancaccio, L. (1989) Isolation of bioactive actinomycetes from marine sediments using rifampicin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31, 609-612.

Pisano, M. A., Sommer, M. J. & Taras, L. (1992). Bioactivity of chitinolytic actinomycetes of marine origin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 553-555.

Rheinheimer, G. (1987) *Microbiología de las aguas*. Editorial Acribia, Zaragoza.

Rinehart, K.L., Gloer, J.B., Hughes, R.G., Renis, H.E & McGovern, J.P. (1981) Didemnins: antiviral and antitumor depsipeptides from a Caribbean tunicate. *Science*, 212, 933-935.

Saadoun, I. & Al-Momani, F. (2000). Activity of North Jordan soil streptomycete isolates against *Candida albicans*. *World. J. Microbiol. & Biotechnol.* 16, 139-142.

Saadoun, I. & Gharaibeh, R. (2002) The *Streptomyces* flora of Jordan and its potential as a source of antibiotics active against-resistant Gram-negative bacteria. *World. J. Microbiol. & Biotechnol.*, 18, 465- 470.

Saadoun, I., Hameed, K. M. & Moussauui, A. (1999) Characterization and analysis of antibiotic activity of some aquatic actinomycetes. *Microbios* 99, 173-179.

Santavy, D. L., Willenz, P. & Colwell, R.R. (1990) Phenotypic study of bacteria associated with the Caribbean sclerosponge, *Ceratoporella nicholsoni*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1750-1762.

Schadebrodt, G.A. (1983) Calidad bacteriológica del agua de la Bahía de Corral en áreas de producción de mitílidos. Tesis, de la escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.

Shirling, E. B. & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 16, 313-340.

Sponga, F., Cavalletti, L., Lazzarini, A., Borghi, A., Ciciliato, I., Losi, D. & Marinelli, F. (1999) Biodiversity and potentials of marine-derived microorganisms. *J. Biotechnol.*, 70, 65-69.

Stierle, A.C., Cardelina, H.J. & Singleton, F.L. (1988) A marine *Micrococcus* produces metabolites ascribed to the sponge *Tedania ignis*. *Experientia* 44, 1021.

Stout, T. J., Clardy, J., Pathirana, I. C. & Fenical, W. (1991) Aplasmomycin C: structural studies of a marine antibiotic. *Tetrahedron*. 47, 3511-3520.

Takisawa, M., Colwell, R. R. & Hill, R. T. (1993) Isolation and diversity of Actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 997-1002.

Tapiolas, D. M., Roman, M., Fenical, W., Stout, T. J. & Clardy, J. (1991) Octalactins A and B: cytotoxic eighth-membered-ring lactones from a marine bacterium, *Streptomyces* sp. *J. Am. Chem. Soc.* 113, 4682-4683.

Tortora, G. J., Funke, B. R. & Case, C. L. (2001) *Microbiology: an introduction*. 7th ed. Benjamin Cummings, San Francisco. 887 p.

Trischman, J. A., Tapiolas, D. M., Jensen, P. R., Dwight, R. & Fenical, W. (1994) Salinamides A and B: anti-inflammatory depsipeptides from a marine streptomycete. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 757-758.

Uribe, N., Polette, M., Asenjo, S., Chahuán, E. & García-Quintana, H. G. (1994) Actividad antibiótica de una bacteria marina del litoral de la X Región de Chile. *Anal. Microbiol. (Chile)* 2, 34-35.

Vining, L. C. (1990) Functions of secondary metabolites. *Ann. Rev. Microbiol.* 44, 395-427.

Xu, L.H., Li, Q.R. & Jiang, C.L. (1996) Diversity of soil *Actinomycetes* in Yunnan, China. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 244-248.

Yamada, T., Minoura, K. & Numata, A. (2002) Halichoblelide, a potent cytotoxic macrolide from a *Streptomyces* species separated from a marine fish. *Tetrahedron Lett.*, 43, 1721-1724.

Zaitlin, B., Watson, S. B., Dixon, J. & Steel, D. (2003) Actinomycetes in the Elbow river basin, Alberta, Canada. *Water Qual Res J Canada* 38, 115-125.

Zar, J. (1999) *Biostatistical analysis*. 4 ed. Prentice-Hall, Inc, New Jersey.

Zengler, K., Toledo, G., Rapee, M., Elkins, J., Mathur, E.J., Short, J.M. & Keller, M. (2002) Cultivating the uncultured. *PNAS* 99, 15681-15686.