UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas

FQF
Facultad de
Química y Farmacia

TRABAJO DE DIPLOMA

Título: Aislamiento y caracterización de actinomicetos endófitos de plantas endémicas cubanas como fuente de nuevos antibióticos

Autor: Saray Vázquez Castañeda

Tutores: : Dra. Milagro García Bernal
Dr. Ricardo Medina Marrero

Santa Clara
Copyright©UCLV

UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas

FQF
Facultad de
Química y Farmacia

DIPLOMA THESIS

Title: Isolation and characterization of endophytic actinomycetes from Cuban endemic plants as a source of new antibiotics

Author: Saray Vázquez Castañeda

Thesis Director: Dra. Milagro García Bernal
Dr. Ricardo Medina Marrero

Santa Clara

Copyright©UCLV

Este documento es Propiedad Patrimonial de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, y se encuentra depositado en los fondos de la Biblioteca Universitaria “Chiqui Gómez Lubian” subordinada a la Dirección de Información Científico Técnica de la mencionada casa de altos estudios.

Se autoriza su utilización bajo la licencia siguiente:

Atribución- No Comercial- Compartir Igual

Para cualquier información contacte con:

Dirección de Información Científico Técnica. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní. Km 5½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP. 54 830

Teléfonos.: +53 01 42281503-1419

Pensamiento

“Existe el peligro de que un hombre ignorante pueda fácilmente aplicarse una dosis insuficiente de antibiótico y, al exponer a los microbios a una cantidad no letal del medicamento, los haga resistentes".

Alexander Fleming

Dedicatoria

Todos mis esfuerzos y todo lo que he logrado en mi vida va dedicado a Dios, esta carrera que he podido sacar adelante solo ha sido muestra de su amor incondicional hacia mí y sin dudar puedo decir que cada día sostuvo mi vida en sus manos.

A mis padres Rafael Vázquez Varverdi y Misleidys Castañeda Beltrán por todo el cariño y apoyo incondicional, porque sin ellos nada hubiera logrado, porque son la razón por la que lucho cada día.

Agradecimientos

No sólo en palabras, sino que con actos quiero agradecerles a todos los que de una forma u otra hicieron posibles que este momento llegara, espero que la vida me dé la oportunidad de poder corresponder tanto amor y tanto respeto a todos.

Quiero agradecer a Dios por su fidelidad, porque me demostró que siempre está conmigo, que tiene cuidado de mí, me demostró que soy fuerte en mi debilidad y que aún hay muchas cosas que son imposibles para el hombre pero que nada es imposible para Dios.

A mis padres, por sus consejos, por sus palabras de ánimos, por sus oraciones día y noche.

En general a toda mi familia, en especial mi abuela, mi tía y primos que siempre estuvieron al tanto de mi vida en la universidad, haciendo que mis días en la universidad fueran más placenteros.

A Mady, amiga especial que la vida me permitió conocer, que me ha ayudado incondicionalmente y ha sido un pilar básico en mi formación profesional.

A mis tutores Ricardo y Milagros por brindarme la oportunidad de ser su tesiante, por toda la ayuda que me han brindado y el conocimiento que me han aportado.

A todos los profesores del departamento de Farmacia por enseñarme y tenerme paciencia.

A mis compañeras de cuarto en especial a Naidi, Grise, Keila, Ange y la Ro con las que compartí momentos de alegrías y tristezas pero que sin lugar a duda son las mejores compañeras que alguien puede tener.

A todos muchas gracias...

Resumen

Los actinomicetos endofíticos son una fuente prometedora de metabolitos novedosos con diversas actividades biológicas. El presente trabajo tuvo como objetivo aislar actinomicetos endofíticos de plantas endémicas de Cuba, caracterizar los mismos y determinar su espectro de actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) y levaduras (*Candida albicans* ATCC 10231) mediante el método de difusión en agar. En este estudio, se recuperó un total de 30 actinomicetos de muestras de hojas, tallos y raíces de 3 plantas endémicas de la región Central de Cuba (*Eugenia clarensis* (Britton & P. Wilson), *Garcinia ruscifolia* var. ruscifolia (Clusiaceae) e *Hygrophila urquiolae*). De las cepas aisladas, dos de ellas (A3 y A4) mostraron las mejores actividades antimicrobianas *in vitro* contra las cepas de referencia ATCC y según las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas fueron identificadas como *Streptomyces* sp. Los actinomicetos aislados de plantas endémicas de la región Central de Cuba representan una valiosa fuente de metabolitos antimicrobianos que pudieran ser utilizados en la práctica clínica.

Palabras clave: actinomicetos endofíticos, plantas endémicas, actividad antimicrobiana.

Abstract

Endophytic actinomycetes are a promising source of novel metabolites having different biological activities. The aim of this study was to isolate endophytic actinomycetes from endemic plants from Cuba, characterize them and determine their antimicrobial activity against gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), gram-negative bacteria (*Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) and yeasts (*Candida albicans* ATCC 10231) through the agar diffusion method. Thirty actinomycetes were recovered from leaf, stem and root samples of three endemic plants (*Eugenia clarensis* (Britton & P.Wilson), *Garcinia ruscifolia* var. ruscifolia (Clusiaceae) and *Hygrophila urquiolae*) of Cuba's central region. Two isolates (A3 and A4) with morphological, physiological and biochemical characteristics of *Streptomyces* sp. showed the best *in vitro* antimicrobial activity against ATCC reference strains. Actinomycetes strains isolated from endemic plants of Cuba are invaluable source of antimicrobial metabolites that might be used in clinical practice.

Índice

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN 1
CAPÍTULO 1: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 4
1.1 Microorganismos endofíticos y su relación con las plantas 4
1.2 Distribución y diversidad de bacterias endofíticas 5
1.3 Aislamiento de actinomicetos endofíticos 7
1.4 Producción de compuestos bioactivos por microorganismos endofíticos ... 9
1.4.1 Capacidad antagónica de los microorganismos endofíticos 12
1.5 Actinomicetos endofíticos 14
1.5.1 Características generales 14
1.5.2 Taxonomía 15
1.6 Actinomicetos como fuente de antibióticos 17
1.7 Plantas endémicas de Cuba 19
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS 23
2.1 Población y muestras 23
2.2 Recolección del material vegetal 23
2.3 Procesamiento de las muestras y aislamiento de actinomicetos 24
2.4 Análisis de la actividad antimicrobiana 25
2.4.1 Cepas de ensayo 25
2.4.2 *Screening* primario 25
2.4.3 *Screening* secundario 25
2.5 Caracterización morfológica y cultural de los actinomicetos 26
2.6 Caracterización bioquímica de los actinomicetos 26
2.6.1 Prueba de la Catalasa 26
2.6.2 Prueba de la Oxidasa 27
2.6.3 Hidrólisis de la Urea 27
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 28
3.1 Aislamiento de actinomicetos de plantas endémicas 28
3.2 *Screening* primario 30
3.3 *Screening* secundario 31
3.4 Caracterización morfológica de las seis cepas de actinomicetos con actividad antimicrobiana 32
CONCLUSIONES 38

RECOMENDACIONES..... 39
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Introducción

INTRODUCCIÓN

La era antibiótica, emprendida en 1941 llamada también como "Edad de Oro" de los antibióticos comienza con la producción de la penicilina a gran escala, revolucionando para siempre el campo de las enfermedades infecciosas. Estos, usados correctamente, pueden salvar vidas, pero hay un creciente problema de resistencia que ocurre cuando las bacterias mutan, es decir, se transforman y se vuelven capaces de resistir los efectos de un antibiótico. [(1)] Según la Organización Mundial de la Salud [(2)] la resistencia a los antibióticos está aumentando en todo el mundo a niveles peligrosos. Día tras día están apareciendo y propagándose en todo el planeta nuevos mecanismos de resistencia que ponen en peligro nuestra capacidad para tratar las enfermedades infecciosas comunes. Un creciente número de infecciones, como la neumonía, la tuberculosis, la septicemia, la gonorrea o las enfermedades de transmisión alimentaria, son cada vez más difíciles y a veces imposibles de tratar, a medida que los antibióticos van perdiendo eficacia.[(2)]. La resistencia antimicrobiana ha emergido como uno de los principales retos en la salud pública, debido a la aparición de patógenos multidrogo-resistentes (MDR), aunado a la presencia de nuevos antibióticos. [(3)] Esta resistencia se da por la aplicación de antibióticos de amplio espectro contra infecciones bacterianas, lo que ejerce una presión de selección. [(4)] Los microorganismos MDR presentan una resistencia adquirida a múltiples clases de antibióticos no relacionados entre sí, debido a su exposición secuencial o adquisición de elementos genéticos mediadores de resistencia. [(4)] La aparición de resistencia obliga a desarrollar nuevos antibióticos con mayor eficacia y seguridad tanto para la salud humana como para el medio ambiente [(3)], ya que algunos de los existentes, aunque son efectivos, presentan efectos colaterales. En este sentido, la búsqueda de compuestos activos contra hongos, virus o cepas bacterianas resistentes a antibióticos, es de suma importancia.

Entre los microorganismos productores de antibióticos, los actinomicetos representan uno de los grupos de microorganismos que producen gran cantidad de metabolitos con actividad biológica. [(5)] Se han detectado más de 40 géneros de

Actinobacterias filamentosas como endófitas en plantas. Entre los endófitos estudiados, las especies de *Streptomyces* que se aíslan de diversas especies vegetales, son un grupo de gran interés debido a su capacidad para producir antibióticos y otros metabolitos secundarios bioactivos. [(6)] Se han descubierto aproximadamente 23.000 metabolitos secundarios bioactivos a partir de microorganismos endofíticos, de estos los actinomicetos endofíticos han producido aproximadamente 10.000 sustancias diferentes y 7.600 metabolitos fueron encontrados del género *Streptomyces*. [(7)] Los actinomicetos producen aproximadamente el 75 % de los antibióticos de uso comercial [(8)]; y son una de las fuentes más atractivas de nuevos metabolitos bioactivos. Sin embargo, la tasa de descubrimiento de nuevos compuestos ha disminuido desde que se han estudiado ampliamente las especies disponibles. [(9)] Recientemente, los actinomicetos raros son una fuente importante de nuevos antibióticos. [(10)] Varios estudios se han orientado hacia el aislamiento de nuevos actinomicetos infrecuentes de entornos inexplorados.

***Problema científico*:**

Para superar la actual crisis derivada de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos multirresistentes se requiere del descubrimiento de antibióticos novedosos, cuya principal fuente han sido los actinomicetos. Sin embargo, el continuado redescubrimiento de antibióticos conocidos a partir de microorganismos aislados del suelo presupone el uso de fuentes alternativas para el descubrimiento de actinomicetos “raros” y consecuentemente nuevos agentes antimicrobianos. En este sentido, las plantas endémicas cubanas son una fuente no explorada de actinobacterias novedosas y de antibióticos derivados de éstas.

Como vía para solucionar el problema científico se formula la siguiente hipótesis:

Las plantas endémicas de Cuba son una fuente importante de actinomicetos endofíticos productores de antibióticos activos contra diversos microorganismos patógenos.

Para complementar la anterior hipótesis y dar respuesta a la problemática científica planteada, se proponen los siguientes objetivos:

Objetivo general

Búsqueda de actinomicetos como fuente de antibióticos de plantas endémicas de la región Central de Cuba.

Objetivos específicos

- Aislar actinomicetos endofíticos de plantas endémicas de la región Central de Cuba.

- Caracterizar los microorganismos aislados a partir de las plantas.

- Determinar el espectro de actividad antimicrobiana de los actinomicetos aislados.

Capítulo 1:

Revisión Bibliográfica

CAPÍTULO 1: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Microorganismos endofíticos y su relación con las plantas

Los microorganismos y las plantas tienen una relación muy estrecha, de hecho, en el suelo que rodea las raíces de las plantas, también llamado rizósfera, encontramos un gran número de bacterias u hongos que benefician la salud de la planta. Incluso, algunos pueden penetrar los tejidos y vivir dentro de la planta sin causar daño. A estos microorganismos se les denominan endófitos, porque viven dentro de los diferentes tejidos, tales como las raíces, tallos, hojas, flores y frutos. Los principales organismos endófitos son las bacterias y los hongos. Al vivir dentro de la planta, pueden intercambiar nutrientes, sustancias que estimulan el crecimiento vegetal o incluso, pueden promover mecanismos de defensa contra patógenos invasores. [11, 12]

Las primeras evidencias de asociación entre microorganismos endófitos y plantas, se originaron de observaciones en tejidos y hojas fosilizadas, lo que soporta la inferencia de que la asociación planta-endófito pudo haber ocurrido junto con la aparición de las primeras plantas en la tierra. Como resultado de esa larga asociación es posible que algunos de estos microorganismos endófitos hayan adquirido un sistema genético para transferir información desde la planta hospedera hasta ellos, o viceversa, garantizando su adaptación a diferentes ambientes y a la planta hospedera. [13]

El estudio de los endófitos ha sido muy amplio, desde hace años se sabe que hongos llamados micorrizas pueden penetrar a la raíz de cientos de especies de plantas a través de la colonización con sus células llamadas ¨hifas¨. Las plantas que son colonizadas por micorrizas, tienen mejores capacidades para acceder a nutrientes del suelo, les permite sobrevivir en condiciones de sequía o enfrentar diferentes adversidades ambientales. Así mismo, numerosas especies de bacterias endófitas pueden residir de forma permanente en todos los tejidos vegetales, donde llevan a cabo funciones como promover el crecimiento, defender a las plantas de patógenos, entre muchos otros beneficios para la planta. Existen también bacterias

que, al colonizar la raíz de la planta, son capaces de forman nuevos órganos, llamados nódulos, dentro de los cuales estas bacterias pueden transformar el nitrógeno atmosférico en amonio, una forma de nitrógeno que la planta puede emplear para su crecimiento y desarrollo.[11]

Cabe destacar que el ser humano ha tomado ventaja de los organismos endófitos y su relación de millones de años con las plantas para mejorar la agricultura; es decir, incrementar la producción de cultivos con importancia agronómica a través de la fertilización con bacterias u hongos que son o que potencialmente pueden ser endófitos. Lo anterior ha representado un incremento en sus producciones de forma importante. Algo que es también de resaltar es que, con el uso de estos microorganismos endófitos, no se daña ni contamina el ambiente, por lo que son una excelente alternativa al uso de químicos que son demasiados tóxicos. Es por ello recomendable tomar ventaja de esta relación endófito-planta para poder ampliar su uso en la agricultura y otros campos investigativos, pues los beneficios económicos y ecológicos son enormes. [11]

1.2 Distribución y diversidad de bacterias endofíticas

Las bacterias endófitas son reconocidas como aquellos microorganismos que residen en tejidos de las plantas, principalmente espacios intercelulares sin causar síntomas de enfermedad en la misma. [13]

Pueden habitar dentro de los tejidos vegetales sin provocar ningún daño, ya sean raíces, tallos, hojas, flores o semillas. Diversos trabajos han demostrado que las bacterias endófitas son capaces de interactuar de una manera muy eficiente con sus hospederos, comparado con aquellas que habitan la filósfera o rizósfera. De hecho, se ha propuesto a la rizósfera uno de los ecosistemas más diversos como una fuente de adquisición de endófitos para las plantas, ya que las grietas de las raíces, así como las diversas heridas de tejidos que ocurren como resultado del

crecimiento de la planta, entre otros daños mecánicos, permiten a las bacterias rizosféricas penetrar y colonizar los tejidos internos. [14]

La densidad poblacional de bacterias endófitas es altamente variable, depende de la especie de bacteria y el genotipo de la planta hospedera, además del estado de desarrollo de la planta, la densidad del inóculo y las condiciones ambientales. Estudios moleculares recientes sobre diversidad de bacterias endófitas han revelado una alta riqueza de filotipos, que promueven el crecimiento de las plantas, suprimen fitopatógenos, ayudan a remover contaminantes, solubilizan fosfato y contribuyen a la asimilación biológica de nitrógeno. [13]

Además, se ha demostrado que los endófitos bacterianos son capaces de inducir vías de resistencia en plantas, aumentando las capacidades de sobrevivir a diversos tipos de estrés ambiental, como el abiótico, salino, entre otros. Los mecanismos benéficos que llevan a cabo las especies endófitas durante la interacción con plantas se han catalogado como directos e indirectos. Los mecanismos directos de promoción del crecimiento vegetal incluyen la producción de proteasas, sideróforos, fitohormonas como el ácido indolacético (AIA), y compuestos como el cianuro de hidrógeno (HCN), entre otros. Por otra parte, los mecanismos indirectos incluyen las acciones inhibitorias, antagónicas o de control biológico de potenciales fitopatógenos. Sin embargo, la producción de algunos compuestos podría traslaparse entre mecanismos directos e indirectos, pudiendo jugar un papel importante durante el biocontrol de patógenos y al mismo tiempo, mejorar la nutrición de la planta. [14]

Un paso importante para conocer las actividades benéficas de las bacterias endófitas de las plantas es conocer su diversidad, y hasta ahora, cada planta que se ha analizado en diversas partes del mundo ha demostrado que contienen microorganismos endófitos, siendo las clases α, β y γ-Proteobacteria de las más comúnmente reportadas, seguido de las clases Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Planctomycetes y Verrucomicrobia. Cabe destacar que la diversidad

y densidad de endófitos depende de diversos factores abióticos (la localización geográfica) y bióticos (la especie vegetal hospedera), y que son pocos los trabajos que han reportado dichos análisis. En cuanto a los géneros detectados como endófitos, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Micrococcus*, Enterobacter*, Pantoea*, *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Herbaspirillum*, *Erwinia*, *Xantomonas* y *Microbacterium* están entre los más abundantes y comúnmente reportados. [12, 14]

1.3 Aislamiento de actinomicetos endofíticos

Una vez en el laboratorio, las muestras vegetales se lavan con agua destilada. Completado este lavado, se hacen divisiones en tercios más pequeños que son esterilizados superficialmente, sumergiendo los segmentos en etanol al 70% v/v (1min), luego en hipoclorito de sodio al 2% v/v (3min), seguido de etanol al 70% (2min) y finalizando con dos enjuagues en agua destilada estéril para evitar el crecimiento de microorganismos epífitos. Una vez realizada la desinfección superficial, los segmentos se ubican en placas con Agar Nutritivo (AN), entre 9 y 15 cuadrados de cada segmento. Estos montajes se incuban a 28 ºC y se realizan observaciones, y colectas diarias de las bacterias emergentes, durante una semana. Las bacterias endófitas que emergen de las secciones se reaislan y purifican. A partir de los aislamientos puros, se realiza una descripción macroscópica de las colonias bacterianas y se conservan en tubos Eppendorf con 1 mL de Caldo Nutritivo (CN) con glicerol al 15% a una temperatura de -20 ºC. (15)

Otros autores prefieren seguir un protocolo de maceración después de tener el material vegetal bien limpio en el cual colocan el mismo en un mortero estéril, con un bisturí realizan cortes para facilitar la salida de los microorganismos seguidamente se agrega NaCl 0.9 % y con una mano de mortero estéril se procede a triturar por un período de 5 segundos, luego se toman alícuotas de 100 µL para realizar el cultivo. Se toma una alícuota de 1 mL y se realizan diluciones en 9 mL de solución salina (0.9 %) hasta la dilución de 10^{-5}. Posteriormente se realiza la siembra

de 100 µL de cada dilución en placas con diferentes medios de cultivo seguidamente las placas se incuban a 26 °C durante 5 días. El crecimiento de microorganismos es verificado cada 24 horas. [16]

Medios de cultivo comúnmente utilizados para el aislamiento de actinomicetos:

- **Agar Caseína Almidón (ACA)** (g L^{-1}): almidón 10 g, K_2HPO_4 2 g, KNO_3 2 g, caseína 0.3 g, $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 g, $CaCO_3$ 0.02 g, $FeSO_4.7H_2O$ 0.01 g y 1000 mL de agua destilada y agar, 15.0 g. [17]

- **Agar Glicerol Aspargina (ISP5)** (g L^{-1}): glicerol,10.0; L-asparagina, 1.0; K_2HPO_4, 1.0; solución de trazas de sal, 1 mL; $FeSO_4.7H_2O$, 0.1; $ZnSO_4.7H_2O$, 0.1; $MnCl_2.4H_2O$, 0.1 y 1000 mL de agua destilada y agar, 20.0. [19]

- **Agar Extracto de Malta-Extracto de Levadura (ISP2)** (g L^{-1}): extracto de levadura, 4.0; extracto de malta, 10.0; dextrosa, 4.0, 1000 mL de agua destilada y agar, 20.0. [20]

- **Agar Tirosina (ISP7)** (g L^{-1}): L-asparagina, 1.0; L-tirosina, 0.5; K_2HPO_4, 0.5; $MgSO_4.7H_2O$, 0.5; NaCl, 0.5; solución de trazas de sal, 1 mL; $FeSO_4.7H_2O$, 1.36; $CuCl_2.2H_2O$, 0.027; $CoCl_2.6H_2O$; Na_2MoO_4, $2H_2O$ 0.025; $ZnCl_2$, 0.02; H_3BO_3, 2.85; $MnCl_2.4H_2O$, 1.8; $NaC_4H_4O_6$, 1.77 y 1000 mL de agua destilada y agar, 20.0. [19]

- **Agar Ácido Húmico** (AAH) (g L^{-1}): ácido húmico, 1.0 g; Na_2HPO_4, 0.5 g; KCl 1.7 g, $MgSO_4$ $7H_2O$, 0.05 g; $FeSO_4$ $7H_2O$, 0.01 g; $CaCl_2$, 1 g; B-vitaminas, 1 mL; 1000 mL de agua destilada y agar 18 g. [18]

En un estudio realizado por Nafis et al. [18], donde aislaron actinomicetos de hojas de *Aloe vera*, primero las hojas fueron lavadas con agua destilada de 1-2 minutos para eliminar las partículas de suelo y se esterilizaron con etanol al 70 % por 10 minutos e hipoclorito de sodio al 1 % por 15 minutos. Para inhibir el crecimiento

de hongos el material vegetal se sumergió 10 minutos en una solución de $NaHCO_3$ 10 %. Posteriormente los materiales vegetales se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se transfirieron a placas Petri con Bennett Agar suplementado con 50 µg mL^{-1} de cicloheximida y 100 µg mL^{-1} de ácido nalidíxico, siendo incubados a 28 ^oC de 1 a 4 semanas.

En otros estudios realizados por Passari et al. [21], Paulraj et al. [22] y Gos et al. [23]; estos autores muestrearon plantas (hojas, tallos, raíces y flores), y las mismas fueron lavadas cuidadosamente con agua destilada de 3 a 5 minutos para eliminar residuos de suelo que pudieran presentar, y consecutivamente fueron cortadas en pedazos de 1 a 2 cm y enjuagados con Tween 20 (0.1 %) por unos segundos. Dichas muestras fueron esterilizadas sumergiéndolas secuencialmente en etanol 70 % por 3 minutos, seguido por NaOCl 0.4 % por 1 minuto, etanol 70 % por 2 minutos y otros tres lavados con agua destilada estéril por 1 minuto cada uno. Las muestras se secaron en una cabina de flujo laminar y luego con ayuda de un bisturí estéril se colocaron en placas Petri con medios de cultivo suplementados con nistatina y cicloheximida (60 µg mL^{-1}) para suprimir el crecimiento fúngico, también se añadió ácido nalidíxico y $K_2Cr_2O_7$, ambos en una concentración de 60 µg mL^{-1} para inhibir el crecimiento de bacterias no deseables. Las placas se incubaron a 26 ± 2 ^oC de 2 a 4 semanas. Las colonias bacterianas que crecieron se conservaron a 4 ^oC.

1.4 Producción de compuestos bioactivos por microorganismos endofíticos

En los últimos años, los compuestos bioactivos tienen una gran demanda en la industria farmacéutica, debido a sus beneficios para la salud humana y vegetal. Los microorganismos sintetizan estos compuestos y algunas enzimas, ya sea solos o en asociación con plantas. Los microorganismos que residen dentro de los tejidos vegetales, conocidos como endófitos, también producen una variedad de estos compuestos, teniendo gran relevancia los actinomicetos endofíticos o

actinobacterias al producir valiosos compuestos bioactivos y metabolitos secundarios. [24]

Existen reportes que las especies de *Streptomyces* sp. aisladas de plantas produce antibióticos novedosos que son eficaces contra bacterias resistentes a múltiples fármacos. Los agentes antimicrobianos producidos por endófitos son ecológicos, tóxicos para los patógenos y no dañan al ser humano. La inoculación endofítica de las plantas modula la síntesis de compuestos bioactivos con altas propiedades farmacéuticas además de promover el crecimiento de las plantas. Las hidrolasas, enzimas extracelulares, producidas por bacterias endofíticas, ayudan a las plantas a establecer una resistencia sistémica contra la invasión de patógenos. Además, las fitohormonas producidas por endófitos juegan un papel esencial en el desarrollo de las plantas y el manejo de la resistencia a la sequía. La gran diversidad de endófitos y su adaptación a diversas tensiones ambientales parecen ser una fuente sin explotar de nuevos metabolitos secundarios. [24]

Estos compuestos bioactivos han servido para el tratamiento de varias enfermedades y tienen aplicaciones potenciales en la agricultura, medicina y en las industrias alimentaria y de cosméticos. Se categorizaron en los varios grupos funcionales, alcaloides, benzopironas, flavonoides, fenoles, quinonas, esteroides, saponinas, taninos, terpenoides y muchos otros. La extracción de metabolitos endófitos se ha visto afectada por varios factores como la temporada de recolección de muestras, las condiciones climáticas y la ubicación geográfica, pero gracias a los procesos utilizados en los últimos años, la extracción se ha vuelto más factible, eficiente y conveniente. [25]

Algunos de los compuestos bioactivos secundarios de endófitos que se encuentran comúnmente son el taxol (el paclitaxol), un alcaloide diterpénico complejo producido por el endófito *Metarhizium anisopliae* que se encuentra en la corteza del árbol Taxus, quien es uno de los agentes anticancerosos más

prometedores desarrollados o sintetizados hasta la fecha. Se sabe que la camptotecina de *Nothapodytes foetida* tiene propiedades citotóxicas y antifúngicas. La huperzina A (HupA), de *Huperzia serrata*, puede actuar como un inhibidor del colinesterasa. El hongo endofítico *Cytonaemasp* produce ácido helvólico, triterpenoide con gran actividad antibacteriana. **(25)**

En la Tabla 1 se muestra una lista de compuestos bioactivos obtenidos de especies de actinobacterias aislados de diversas fuentes, sus metabolitos bioactivos y sus usos como fuente de medicamentos contra diversas patologías. **(26)**

Tabla 1. Diversidad de actinobacterias endofíticas con acción terapéutica aisladas de plantas.

Compuestos Bioactivos	Ambiente	Fuentes de las plantas	Aplicación terapéutica	Especies Actinobacterias
ALCALOIDES				
Anisomicina	Templado	*Aucuba japonica*	Antitumoral	*Streptomyces thermoviolaceus* TP-A0648
Dicetopiperazina	Tropical	*Zingiber spectabile*	Antibacteriano	*Streptomyces* sp. SUK25
Ácido 1-vinil-b-carbolina-3-carboxílico, Indol-3-carbaldehído, ácido indol-3-acético y ácido indol-3-carboxílico	Acuático (humedal)	*Vochysia divergens*	Antibacteriano	*Microbispora* sp. LGMB259
POLIQUÉTIDOS				
Claritromicina	Tropical	*Clethra barbinervis*	Antifúngico	*Streptomyces hygroscopicus* TP-A0623
TERPENOS Y TERPENOIDES				
Dimetil novobiocina	Templado	*Aucuba japonica*	Antimicrobiano	*Streptomyces* sp. TPA0556
Xiamicina	Mangle	*Bruguiera gymnorrhiza*	Antiviral	*Streptomyces* sp.GT2002/1503
COUMARINAS (ALFA BENZOPIRONAS)				
5,7-dimetoxi-4-pmetoxilfenilcumarina; 5,7-dimetoxi-4-fenilcumarina	Tropical	*Zingiber officinale*	Antifúngico, Antioxidante, Antitumoral	*Streptomyces aureofaciens* CMUAc130

Saadamicina	Marino	*Aplysina fistularis*	Antifúngico	*Streptomyces* sp. Hedaya 48
FLAVONOIDES (GAMMA BENZOPIRONAS)				
7-metoxi-3, 3 ', 4', 6-tetrahidroxiflavona y 2 ′, 7-Dihidroxi-4 ′, 5′-Dimetoxiisoflavona, Fisetina, Naringenina, 3′-Hidroxidaidzeína, Xenognosina	Tropical	*Boesenbergia rotunda* (L.)	Antibacteriano	*Streptomyces* sp. BT01
QUINONAS				
Alnumicina	Templado	*Alnus glutinosa*	Antibacteriano	*Streptomyces* sp.DSM 1175
Celastramicina A y B	Templado Tropical	Plantas de la familia *Celestracae*	Antibacteriano Antimicobacte-riano	*Streptomyces setonii*, sp. Q21, *Streptomyces sampsonii*, QuH- 8

1.4.1 Capacidad antagónica de los microorganismos endofíticos

Hoy en día se viene apostando por el uso de microorganismos antagonistas para el control de fitopatógenos en los diversos tipos de cultivo, reduciendo de esta manera el uso de métodos químicos que provocan un impacto ambiental negativo y que posteriormente pueden inducir a la aparición de patógenos resistentes. Entre los microorganismos más importantes del suelo están los actinomicetos, en especial los del género *Streptomyces*; puesto que tienen la capacidad de sintetizar compuestos bioactivos, los cuales presentan actividad antagonista contra diversas bacterias y hongos fitopatógenos sin ocasionar efectos tóxicos a las plantas. [(27)]

Caro [(27)] , realizó el aislamiento de actinomicetos de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum* ssp. andigena) para evaluar su capacidad antagónica frente a los

principales fitopatógenos que afectan a este tubérculo; con perspectivas de aplicación como agentes de biocontrol a nivel de campo obteniéndose que, del total de actinomicetos aislados, el 87.8 % (43 actinomicetos) presentaron actividad antagonista al menos frente a uno de los microorganismos fitopatógenos ensayados, con un porcentaje de inhibición mayor al 10 %.

En otro estudio realizado por Pérez [28] se aislaron 85 actinomicetos del compost y evaluaron la actividad antagonista de los actinomicetos frente a fitopatógenos que afectan el cultivo de la papa, de los aislados, 23.5 % tuvieron actividad frente *Ralstonia solanacearum*, 16.4 % a *Pectobacterium carotovorum*, 43.5 % a *Phytophthora infestans*, 25.8 % a *Fusarium* sp y 61.1% a *Rhizoctonia solani*. Extractos orgánicos obtenidos con acetato de etilo y diclorometano de las cepas seleccionadas mostraron actividad antimicrobiana. Esto nos permite afirmar que estos microorganismos pueden ser candidatos para ser usados como agentes biológicos en la producción de esta cosecha como parte de las prácticas de la agricultura sustentable.

Con el objetivo de evaluar la actividad antimicrobiana frente a bacterias multi-drogo resistentes, se estudiaron 234 cepas de actinobacterias aisladas de suelo de Argentina y Perú. Se seleccionaron 13 cepas sobre la base de su actividad antagonista contra *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (SAMR) y *Enterococcus* resistente a vancomicina (EVR-van A y van B). La presencia de los genes NRPS, PKS-I y PKS-II fueron investigados por técnicas de PCR. Entre las 13 actinobacterias seleccionadas, la cepa AC69C mostró la mayor actividad en las pruebas de difusión en medio sólido y se evaluó posteriormente la producción de metabolitos antagonistas en medios líquidos. Los mejores resultados se lograron en caldo de fermentación con carbohidratos, al usarse en combinación almidón y glucosa. Se obtuvieron actividades antimicrobianas de 640 unidades arbitrarias (3), 320 UA, 320 UA y 80 UA contra EVR-van A, EVR-van B, *Listeria monocytogenes* ATCC7644 y SAMR, respectivamente. La amplificación por PCR
del gen ARNr 16S y el análisis filogenético subsecuente de la cepa AC69C exhibieron una homología del 100 % con *Streptomyces antibioticus* NRRL B-1701. Los resultados de este trabajo demuestran la amplia distribución de las actinobacterias en el suelo y la importancia del aislamiento de estos microorganismos para la búsqueda de nuevos metabolitos activos contra bacterias multi-drogo resistentes de origen clínico. [29]

1.5 Actinomicetos endofíticos

La palabra actinomiceto deriva del latín *aktino* que significa “sol”, “rayo” o “en disposición radiada”, y hace referencia a estructuras “con filamentos”, y *mycete*, “hongo”. Es decir, fueron descritos inicialmente como hongos radiales que formaban finos filamentos; esta descripción viene de su morfología de crecimiento macroscópico, que es muy similar a la de los hongos. Ahora se ubican como bacterias “superiores” y, por tanto, quedan incluidos dentro del reino Eubacteria (antes Monera). [30]

1.5.1 Características generales [30]

- Los actinomicetos, llamados también actinobacterias, son microorganismos procariontes.

- La mayoría forman estructuras filamentosas de diámetro muy pequeño, menor a 1 µm (micelio microsifonado), con un promedio de 0.2 a 0.8 µm, rectas, ondulantes, flexuosas y ramificadas (laterales o dicotómicas).

- Algunas especies son tabicadas, aunque por el tamaño tan pequeño es difícil distinguir los septos en el microscopio óptico.

- Poseen un alto contenido en guanina+citosina, que alcanza valores en torno al 70 %.

- Los actinomicetos en medios sólidos forma colonias limitadas, algunas de tipo bacteriforme y otras rocosas, acuminadas, con finos filamentos o hifas nutritivas; en medios líquidos tienden a crecer como masas de micelio, a veces lobuladas o fragmentadas; este fenómeno también se da cuando parasitan (formación de granos), lo cual para algunos autores es similar a la formación de biopelículas.

- Estos microorganismos tienen núcleo difuso y presentan un cromosoma único disperso en el citoplasma; tienen ribosomas, pero no contienen mitocondrias ni sistema endomembranoso (retículo endoplásmico y aparato de Golgi), y la membrana celular no está compuesta por esteroles como los hongos, sino que tiene una bicapa de fosfolípidos con inclusiones proteicas y péptidos.

- Su pared celular es similar a la de todas las bacterias y está formada por derivados de ácido murámico, por lo que todos los actinomicetos son grampositivos.

- Se reproducen como los hongos a través de la producción de esporas, conidias desnudas en cadenas, en esporangios, en la mayoría de los géneros del suelo excepto Actinomyces.

- Las condiciones climáticas controlan su número y variedad poblacional. La mayoría son aerobios estrictos, que crecen bien a temperaturas en el orden de los 25 ºC, y por tanto son microorganismos mesófilos; y a pH alcalino (pH ≈ 9).

- Se nutren de compuestos orgánicos (heterótrofos). Abundan sobre los materiales orgánicos que aporta la naturaleza o el hombre a su superficie, al ser capaces de descomponer una gran cantidad de substratos carbonados.

- En zonas templadas, existen de 100.000 a 100 millones por gramo, siempre que el pH no baje de 5, estas cifras bajan mucho en turbas ácidas, tundra y suelos encharcados.

1.5.2 Taxonomía

Tradicionalmente, los sistemas de clasificación de los actinomicetos se han basado en la morfología y en sus características fisiológicas. Sin embargo, los estudios más recientes basados en el análisis de las secuencias han demostrado que los antiguos

esquemas taxonómicos no reflejan las verdaderas relaciones entre los grupos de actinomicetos. [30]

Como la clasificación de los actinomicetos estaba basada en caracteres morfológicos, estos estaban incluidos entre los hongos, siendo clasificados como "hongos radiados", debido a que presentaban un micelio verdadero. En la actualidad los actinomicetos se encuentran incluidos en el dominio Bacteria debido a que presentan propiedades relativas a este, sin embargo, se realizan estudios polifásicos, que incluyen caracteres fenotípicos, genotípicos, fisiológicos, quimio taxonómicos, técnicas cromatográficas, microscopía electrónica, entre otros, para llevar a cabo una correcta identificación hasta el nivel de especie. [31]

Dese 1997 se propone una nueva clasificación jerárquica apoyada en las relaciones filogenéticas en base a las secuencias del gen del ARN ribosomal 16S. La pertenencia de una nueva cepa a la clase Actinobacteria requiere valores de similitud de la secuencia 16S superiores al 80 %. [30]

Ahora bien, a pesar del enorme valor taxonómico de las filogenias ribosomales, actualmente se sabe que las secuencias del ARN ribosomal 16S, por su alto grado de conservación, son insuficientes para distinguir especies estrechamente relacionadas dentro de un género ni, por supuesto, distintas cepas dentro de una misma especie. Es por ello, que se hace necesario incluir la filogenia de varios genes codificadores de proteínas, implicados en funciones esenciales del mantenimiento celular ("genes *housekeeping*"). Estos genes, por tener una mayor tasa evolutiva producen filogenias más resolutivas para las especies cercanas. En la taxonomía de los actinomicetos los más utilizados son el gen *atpD* (que codifica la subunidad F1-beta de la ATP-Sintasa,), gyrB (subunidad B del DNA girasa), recA (recombinasa A), rpoB (subunidad-b de la RNA polimerasa) y trpB (subunidad-b triptófano sintasa). [30]

Actualmente, la clasificación del phylum Actinobacteria sugerida en el Manual Bergey de Bacteriología Sistemática ha limitado los rangos taxonómicos de subclases y subórdenes, reconociendo únicamente los rangos de clases y órdenes.

Por lo tanto, este phylum está dividido en seis clases: Actinobacteria, Acidimicrobiia, Coriobacteria, Nitriliruptoria, Rubrobacteria y Thermoleophilia. [32-33]

Phylum: Actinobacteria
Clase: Actinobacteria
Orden: Actinomycetales

El Orden Actinomycetales es uno de los 15 órdenes clasificados en la Clase Actinobacteria. La mayoría de los integrantes de este orden son Gram positivos, bacilos no móviles rectos o ligeramente curvados, algunos de los cuales tienden a formar filamentos ramificados de hasta 1 mm de diámetro. La facilidad de la fragmentación de los filamentos produce formas bacilares o cocoides. Las colonias pueden ser filamentosas dando una apariencia micelial, pero no se da la formación de un verdadero micelio aéreo. La mayoría de especies producen colonias blancas o grises predominantemente, mientras que ciertos grupos pueden desarrollar colonias pigmentadas de color rojo oscuro, rojizo, marrón, rosa o amarillento. [34]

La mayoría de sus miembros son anaerobios facultativos, con algunas excepciones. El dióxido de carbono estimula el crecimiento de muchas especies. La reducción del nitrato varía entre géneros y especies. Todos los miembros de este grupo son quimiorganotrofos. Los productos finales de la fermentación de la glucosa incluyen ácido acético, láctico y succínico, con alguna variación en las cantidades de estos ácidos producidos por miembros de diferentes géneros. [34]

1.6 Actinomicetos como fuente de antibióticos

Se conoce que los antibióticos son sustancias con la capacidad de inhibir el crecimiento de las bacterias (bacteriostáticos) o erradicarlas (bactericidas). [35]

Los patógenos que causan determinadas infecciones tienen una alta incidencia en pacientes en terapia intensiva, con heridas superficiales, trasplantes, personas con catéter o conectadas a un ventilador, o con cirugía previa, además de adultos mayores e individuos neonatos; es decir, pacientes inmunocomprometidos ya que

son patógenos que atacan de manera oportunista. Con la creciente extensión de la multirresistencia, es imperativo el desarrollo de nuevas terapias antimicrobianas. [35]

Los actinomicetos son también conocidos por su amplio metabolismo secundario, pues producen moléculas biológicas de alto valor comercial, ya que son la base de aproximadamente dos tercios de los antibióticos como la estreptomicina, vancomicina y tetraciclina actualmente utilizados en clínica. Así mismo son conocidos por sus propiedades como antivirales, anticancerígenos, antihelmínticos, antifúngicos o inmunomoduladores. [27]

Los antibióticos producidos por las bacterias del suelo han servido como modelo para el diseño de nuevas estructuras químicas con actividades semejantes. Al día de hoy, alrededor de la mitad de todos los antibióticos de uso clínico se derivan de los actinomicetos. [36]

La tabla 2 muestra los principales antibióticos de origen natural producidos por microorganismos. [36]

Tabla 2. Principales antibióticos de origen natural producidos por microorganismos

Antibióticos	
Aminoglucósidos	
Kanamicina	*Streptomyces kanamycetius*
Gentamicina	*Micromonospora purpurea*
Trobramicina	*Streptomyces tenebrarius*
Sisomicina	*Micromonospora inyoensis*
Natamicina	*Streptomyces natalensis*
Neomicina	*Streptomyces fradiae*
Estreptomicina	*Streptomyces griseus*
Macrólidos	
Josamicina	*Streptomyces narbonensis var.* Josamyceticus
Midecamicina	*Streptomyces mycarofaciens*
Espiramicina	*Streptomyces ambofaciens*

Eritromicina	*Saccharopolyspora erythraea*
	Streptomyces erythreus
B-lactámicos	
Penicilina	*Penicillium chrysogenum*
Cefalosporina	*Cephalosporium acremonium*
Cabapenem	*Streptomyces cattleya*
Glucopéptidos	
Vancomicina	*Streptomyces orientalis*
Teicoplanina	*Actinoplanes teichomyceticus*
Otros	
Cloranfenicol	*Streptomyces venezuelae*
Nistatina	*Streptomyces noursei*
Daptomicina	*Streptomyces roseosporus*
Anfotericina B	*Streptomyces nodosus*
Tetraciclinas	*Streptomyces roimosus*
	Streptomyces aureofaciens
Pristinamicina	*Streptomyces pristinaespiralis*
Lincomicina	*Streptomyces lincolnensis*
Fosfomicina	*Streptomyces fradiae*
Rifampicina	*Amycolatopsis mediterranei*

1.7 Plantas endémicas de Cuba

La gran diversidad de la flora y fauna, hacen de Cuba un verdadero paraíso natural, siendo tan heterogéneas la una como la otra lo cual las hace sobresalir por su extraordinaria riqueza y su considerable endemismo. El archipiélago cubano cuenta con una flora que posee casi 8 mil especies, cifra que lo ubica dentro de los territorios insulares más ricos en plantas a nivel mundial, con alrededor del 45 % de estas especies endémicas o exclusivas de nuestro país, cuya potencialidad terapéutica de sus compuestos biológicamente activos: flavonoides, cumarinas, triterpenos, mucílagos, entre otros es muy elevada, y por tanto son los responsables de mecanismos tales como antibacterianos, cicatrizantes o antifúngicos. [37]

La región Central de Cuba y particularmente Villa Clara presenta diversas formaciones vegetales con un registro de alrededor de 15 especies de plantas endémicas locales y numerosas endémicas del país. [38]

El distrito *Claraënse* incluye a los afloramientos de Motembo (extremo más occidental), los de Santa Clara (al sur de la ciudad del mismo nombre y la Sierra Alta de Agabama) y los afloramientos al norte de la provincia de Sancti Spíritus, los que en su conjunto forman una unidad fitogeográfica, caracterizada por su endemismo, ya que cuenta con alrededor de 102 especies endémicas (31.9 % del total) lo cual es el reflejo del estado de conservación de la vegetación y la presencia de un mayor porciento de rocas serpentinosas lo que determina la existencia de una flora muy especializada (Figura 1). [38]

Figura 1. Ubicación geográfica de la zona de estudio

La especie *Eugenia clarensis* (Britton & P.Wilson) es una de las especies endémicas locales de la flora de Cubanacán, zona situada en el Centro de la provincia de Villa Clara, alrededor de su capital de Santa Clara. [39]

Es un arbusto de hasta 6m, presenta ramitas pubérulas; hojas oblongas a oblongo-oblanceladas, subcoriáceas, de 1-2,5 cm, agudas en el ápice, la base obtusa, nervios laterales inconspicuos, tuberculadas en el haz y punteadas en el envés; flores solitarias o 2-4; pedícelos de 2-4 mm, pubescentes; cáliz pubescente,

glóbulos ciliados, acuminados; baya globosa; glandulosa, de un 1cm (Figura 2A y B). [39]

Figura 2. Especie *Eugenia clarensis* Britton & P.Wilson. (A) planta y (B) rama.

Garcinia ruscifolia es endémica de la provincia de Sancti Spíritus, específicamente de la región de San Felipe, con una poblacción puntual de escasos individuos. [38] Presenta hojas nano-nanófilas, lámina con el ápice mucronado-espinoso, su distribución es en la zona central y oriental de Cuba, es una especie en estado de conservación amenazada y presenta propiedades medicinales; además es una planta melífera con propiedades medicinales (Figura 3). [40]

Hygrophila urquiolae perteneciente a la familia *Acanthaceae* es endémica de la provincia de Villa Clara; epecificamente del municipio de Sagua la Grande según reportes de expediciones botánicas realizadas y se pude encontrar en humedales y herbazales secundarios (Figuras 3 y 4). [41]

Figura 3. *Garcinia ruscifolia* con flores y frutos.

Figura 4. Flores y frutos jóvenes de *Hygrophila urquiolae.*

Capítulo 2:

Materiales y Métodos

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se realizó con el objetivo de aislar cepas de actinomicetos capaces de producir metabolitos con actividad antibacteriana de plantas endémicas de Cuba, usando medios de aislamiento selectivos.

2.1 Población y muestras

Se recolectaron muestras de tres plantas endémicas de Cuba, específicamente *Eugenia clarensis (Britton & P.Wilson), Garcinia ruscifolia var. ruscifolia (Clusiaceae)* y *Hygrophila* urquiolae de la región Central de Cuba.

2.2 Recolección del material vegetal

El material vegetal se colectó en buen estado vegetativo y exento de materias extrañas, identificándose a través de herramientas taxonómicas por especialistas del Centro de Estudios del Jardín Botánico de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. La identificación se realizó mediante observación directa de las plantas, comparándolas con descripciones pormenorizadas de la planta en la literatura especializada de las especies en estudio. Adicionalmente, se comparó con la muestra correspondiente del Herbario del citado Centro de Estudios, correspondiendo en su totalidad con las características botánicas para dichas especies.

Se recolectaron hojas, tallo y raíces en diferentes partes de la región Central de Cuba (Zona Cubanacán en el centro de la provincia de Villa Clara, la región de San Felipe en la provincia de Sancti Spíritus y del Área Protegida “Mogotes de Jumagua”, municipio Sagua La Grande en la provincia Villa Clara), teniendo en cuenta que fueran sanas, de tonalidad más verdosa, jóvenes y sin fracturas. Las mismas se colocaron en bolsas de papel estériles que fueron transportadas de inmediato al laboratorio de Microbiología del Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, en donde fueron procesadas.

2.3 Procesamiento de las muestras y aislamiento de actinomicetos

Las muestras de tallos, hojas y raíces de las plantas frescas se lavaron con abundante agua de la pila. Luego se procedió a desinfectar las mismas con hipoclorito de sodio (NaOCl) 3-5 % durante 4-10 minutos, seguidamente se esterilizaron con Tiosulfato de sodio (2.5 %) durante 4-10 minutos. Después de transcurrido ese tiempo se utilizó etanol al 70 % durante 5 minutos, y por último se desinfectaron con una solución de bicarbonato de sodio durante 10 min. Al finalizar, las muestras de las plantas se enjuagaron con abundante agua estéril para arrastrar los agentes desinfectantes y se dejaron secar a temperatura ambiente para utilizarlas con posterioridad. **(42)**

Después de concluir el proceso de desinfección, las muestras se dividieron en pequeños fragmentos de aproximadamente 1 cm con ayuda de un bisturí estéril. A continuación, se transfirió asépticamente cada fragmento a placas de Agar Caseína Almidón (ACA) (almidón 10 g, K_2HPO_4 2 g, KNO_3 2g, caseína 0.3 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 g, $CaCO_3$ 0.02 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g, agar 15 g, agua destilada 1L), Agar Ácido Húmico (AAH) (ácido húmico 1 g, K_2HPO_4 0.5 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001 g, agar 20g, solución de vitamina B 1 mL (tiamina-HCl (50 mg), riboflavina (50 mg), niacina (50 mg), piridoxina-HCl (50 mg), inositol (50 mg), Ca-pantotenato (50 mg), ácido p-aminobenzoico (50 mg), biotina (25 mg) y agua destilada (100 mL) y Agar Agua de la Pila (AAP) (agar 15 g, agua de la pila 1L), suplementados con cicloheximida (100 µg mL^{-1}) y ácido nalidíxico (30 µg mL^{-1}) para evitar el desarrollo de especies indeseables, particularmente de hongos. **(43)**

Las placas se incubaron a 28 ºC durante 21 días. Las colonias aisladas con morfología típica a actinomicetos (cultivos puros) se conservaron en 20 % de glicerol a -20 °C para estudios posteriores. **(43)**

2.4 Análisis de la actividad antimicrobiana

2.4.1 Cepas de ensayo

Se utilizaron microorganismos de referencia *Staphylocuccus aureu* ATCC 25923*, Escherichia coli* ATCC 25922*, Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Candida albicans* ATCC 10231; cepas ATCC (American Type Culture Collection; http://www.atcc.org), de la colección de microorganismos del Laboratorio de Microbiología del Centro de Bioactivos Químicos (CBQ), de la Universidad Central de Las Villas.

2.4.2 *Screening* primario

La actividad antibacteriana de los actinomicetos aislados fue realizada por el método de estrías perpendiculares. [44] Se prepararon placas de agar Muller Hinton (AMH) para determinar la actividad frente a las tres bacterias de referencia y placas de agar Dextrosa-Sabouraud (ADS) para *Candida albicans*. Los actinomicetos fueron inoculados por una sola estría en el centro de las placas AMH y en ADS, e incubados de 28-30 ºC durante 7 días. Los organismos de ensayo fueron estriados perpendicularmente al aislado del actinomiceto respectivo, y luego, las placas fueron incubadas a 37 ºC durante 24 horas para las bacterias y a 30°C durante 48 horas para *C. albicans*. Se prepararon los controles sin inocular los actinomicetos para evaluar el crecimiento normal de los organismos de la prueba. La actividad antagónica se observó midiendo la zona de inhibición con un vernier después de 24 horas. [45] Una vez realizado lo anterior y basado en la zona de inhibición contra los microorganismos de prueba, los actinomicetos potenciales fueron seleccionados para un *screening* secundario. [46]

2.4.3 *Screening* secundario

A las cepas que presentaron actividad en el tamizaje primario se les realizó un *screening* secundario, mediante el método de difusión en agar. [47] Para tal propósito, cada una de las cepas de actinomicetos se sembró en placas de ACA (tres réplicas por cepa) y se incubó a 28 °C durante 7 días. Las cepas de referencia se sembraron en toda la superficie de las placas petri con Agar Triptona Soya (ATS), estableciendo una carga microbiana inicial de $1x10^8$ UFC mL^{-1}. Seguidamente, se extrajeron muestras circulares en forma de disco (plugs) de 6 mm de las placas con actinomicetos y se colocaron sobre la superficie de las placas sembradas con las cepas de referencia, utilizando como control, plugs sin actinomicetos. La actividad antimicrobiana se evaluó y se expresó tomando como referencia el diámetro del halo de inhibición (mm), alrededor de cada plug, el cual se midió con un vernier a las 24 horas de incubación a 37ºC para las bacterias y a las 48 horas a 28 °C para *C. albicans.* [48]

2.5 Caracterización morfológica y cultural de los actinomicetos

Los actinomicetos seleccionados según su actividad antimicrobinada fueron caracterizados por su comportamiento cultural en los medios de aislamiento luego de una incubación a 28 °C por 21 días. Se determinaron las características de las colonias por su tamaño, forma, color, textura, elevación, pigmentación del micelio aéreo y de substrato. [49] Las observaciones microscópicas se realizaron principalmente para determinar la forma y tamaño celular y sobre todo para observar la ornamentación y disposición de las esporas como estructuras de reproducción, utilizando la técnica de los microcultivos, además de la tinción de Gram. [49,50]

2.6 Caracterización bioquímica de los actinomicetos [51]

2.6.1 Prueba de la Catalasa

Se utilizó para comprobar la presencia de la enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias que contienen citocromo. Para ello se depositó una gota de Peróxido de Hidrógeno al 30 % sobre un portaobjetos

y haciendo uso de un asa de argolla se añadió sobre el reactivo la masa bacteriana. El resultado será positivo si se observa la producción de pequeñas burbujas como resultado de la degradación de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso.

2.6.2 Prueba de la Oxidasa

Al ser la mayoría de los actinomicetos aerobios estrictos, la prueba de la Oxidasa permite poner de manifiesto el sistema citocromoxidasa, que se encuentra en organismos de este tipo. Para ello se usó el método directo en donde se adicionó una gota del reactivo de Kovacs. El resultado es positivo si se produce una reacción de color violeta a los pocos segundos.

2.6.3 Hidrólisis de la Urea

Pone de manifiesto la actividad de la enzima ureasa que poseen ciertos microorganismos, para degradar la urea en dos moléculas de amoniaco. Para ello se inoculó la colonia en Caldo Urea contenido en tubos de ensayos y se incubó a 28 °C durante 10 días. Si la Hidrólisis por producción de ureasa es Positiva el medio se torna color rosa fucsia y si el medio torna a una coloración amarilla es negativo.

Capítulo 3:

Resultados y Discusión

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Aislamiento de actinomicetos de plantas endémicas

Según la morfología de las colonias se aislaron y purificaron un total de 30 cepas de actinomicetos procedentes del muestreo de plantas endémicas de la región Central de Cuba *Eugenia clarensis* (Britton & P.Wilson), *Garcinia ruscifolia* var. ruscifolia (Clusiaceae) y *Hygrophila urquiolae*, por ser Gram positivos, esporulados y presentar micelios aéreos y de sustrato, características que presentan los actinomicetos. [52]

Se utilizaron medios de agar ACA, AAH y AAP para el aislamiento de los actinomicetos. Se aislaron un total de 30 cepas de actinomicetos de las tres muestras de plantas estudiadas. De los tres medios utilizados, con ACA se obtuvo mayor porcentaje de actinomicetos aislados, este medio de cultivo es reconocido como un medio excelente para el aislamiento de actinomicetos endofíticos. [53] Por lo tanto, el número máximo de aislamiento se registró en agar caseína almidón, seguido del agar ácido húmico; mientras que el AAP resultó menos favorable para el aislamiento de actinomicetos (Figura 5).

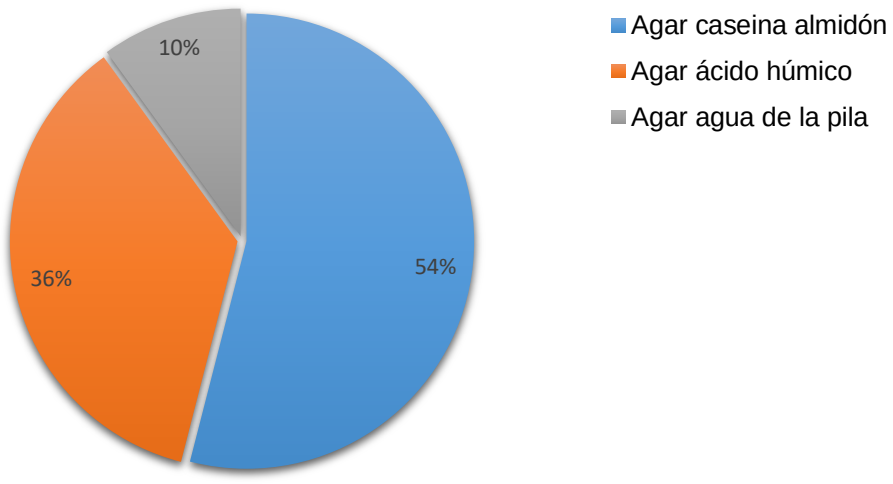

Figura 5. Porcentaje de cepas de actinomicetos aisladas en diferentes medios de cultivos.

La disponibilidad de nutrientes es uno de los principales factores determinantes en el crecimiento de diversos microorganismos, incluyendo a los actinomicetos. A diferencia de otros grupos de bacterias que requieren fuentes de carbono y nitrógeno más simples, los actinomicetos son microorganismos que pueden usar como fuente de energía, una amplia variedad de compuestos, tales como almidón, proteínas, glucosa y aminoácidos. [(54)]

Al estudiar los actinomicetos se debe tener en cuenta el medio de cultivo empleado para su aislamiento, por lo que se emplean medios de cultivos selectivos para ello. Además, la capacidad de estos microorganismos para producir antibióticos no es una característica constante, sino que puede ser incrementada o disminuida, dependiendo de los medios de cultivos que se empleen. [(55)] La composición y las concentraciones de los componentes en los medios de cultivo están estrechamente relacionadas con las capacidades metabólicas del organismo productor que influyen en la biosíntesis de las moléculas bioactivas. [(56)]

Los actinomicetos endófitos fueron aislados de tejidos como raíces, tallos y hojas de las plantas evaluadas. Los resultados obtenidos mostraron que se encontró mayor densidad poblacional de bacterias endofítas en la raíz con un total de 20 aislados en comparación con el tallo donde el promedio fue de 7 y en las hojas de 3 actinomicetos endofíticos (Tabla 3). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Pérez et al. [(57)] en un estudio donde se demostró que la mayor cantidad de bacterianas endófitas fueron observadas en la raíz y en la parte inferior del tallo, presentándose decrecimiento de estas en las hojas.

Tabla 3. Aislamiento de actinomicetos endofíticos de plantas endémicas de la región Central de Cuba.

Plantas endémicas	Tallo	Hojas	Raíz
Eugenia clarensis (Britton & P.Wilson)	2	1	8
Garcinia ruscifolia var. ruscifolia	1	2	7
Hygrophila urquiolae	4	-	5
Total	7	3	20

3.2 *Screening* primario

Los actinomicetos producen diferentes tipos de compuestos bioactivos, con acción antibacteriana, antifúngica y anticancerígena y la presente investigación reveló la importancia de los actinomicetos endofíticos como una potente fuente de compuestos antimicrobianos, para su potencial aplicabilidad en la práctica clínica. **(58,59)**

De las 30 cepas de actinomicetos aisladas, el 20 % (n=6) mostraron actividad antibacteriana contra al menos una de las cepas de referencia evaluadas (Figura 6). Aquellos aislados con una amplia gama de actividad antibacteriana durante el cribado primario, se sometieron a un cribado secundario, aplicando el método de difusión en agar.**(47)**

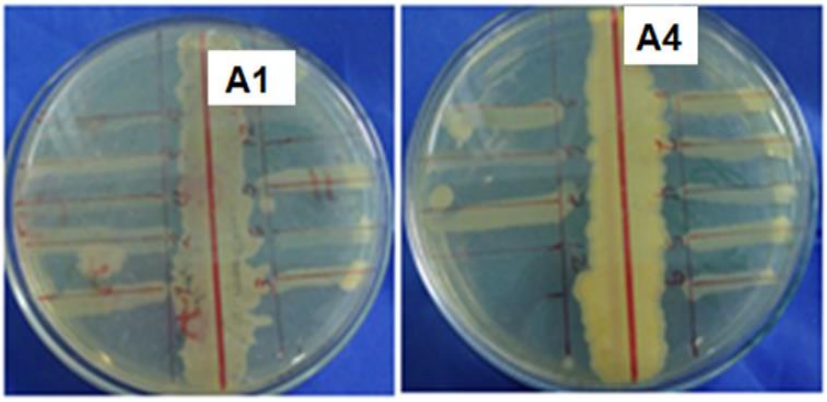

Figura 6. Screening primario de cepas de actinomicetos y evaluación de su potencialidad contra cepas de referencia, aplicando el método de estrías perpendiculares.

3.3 *Screening* secundario

De las seis cepas de actinomicetos seleccionadas en el screening primario, los aislados A3 y A4 mostraron un amplio espectro de actividad contra todos los patógenos probados (*Staphylocuccus aureu* ATCC 25923*, Escherichia coli* ATCC 25922*, Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 *y Candida albicans* ATCC 10231), mostrando una actividad significativa contra *S. aureus* ATCC 25923 (A3=31 mm y A4=22 mm), *E. coli* ATCC 25922 (A3=22 mm y A4=18 mm), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (A3=12 mm y A4=11 mm) y *C. albicans* ATCC 10231 (A3=10 mm y A4=12 mm) (Figura 7 y Tabla 4).

De estas 6 cepas solo A1, A3 y A4 fueron capaces de inhibir el crecimiento bacteriano de todos los patógenos de este tipo en prueba, mostrándose en todos los casos una gran zona de inhibición por parte de dichos actinomicetos.

Además, las 6 cepas mostraron actividad antifúngica frente a *Candida albicans* ATCC 10231 no siendo los mayores valores inhibitorios mostrados por dichas cepas de actinomicetos.

Estos resultados coinciden con estudios realizados por Panwar et al. [(60)], donde aislaron actinomicetos de suelos con potencial antagónico, inhibiendo el crecimiento en mayor proporción de bacterias Gram positivas en comparación con las Gram negativas; ya que estas últimas poseen mecanismos de resistencia como las bombas de expulsión con lo cual evitan que el antibiótico llegue a su sitio de acción. También llevan a cabo modificación enzimática del antibiótico, mecanismos frecuentes en *Escherichia coli* que poseen β- lactamasas de espectro extendido, las cuales confieren resistencia a una serie de antibióticos. Las bacterias Gram positivas por otra parte no poseen porinas en su membrana externa, las cuales son proteínas capaces de regular la entrada de algunos compuestos, entre ellos, los antibióticos. [(61)]

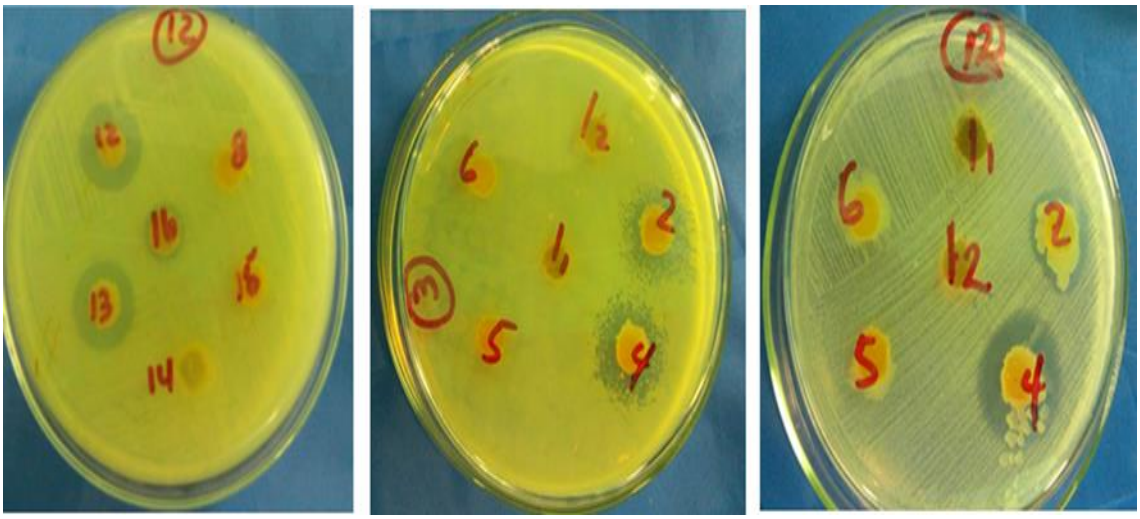

Figura 7. Actividad antimicrobiana de los aislados de actinomicetos seleccionados en el screening primario frente a cepas de referencia ATCC (método de Kirby-Bauer).

Tabla 4. Actividad antimicrobiana de cepas de actinomicetos seleccionadas del screening primario de plantas endémicas de la región Central de Cuba.

Aislados	Zona de Inhibición (mm)			
	S. aureus	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*C. albicans*
A1	20	16	10	9
A2	15	-	9	8
A3	31	22	12	10
A4	22	18	11	12
A5	14	-	-	7
A6	10	-	-	8

3.4 Caracterización morfológica de las seis cepas de actinomicetos con actividad antimicrobiana

Las colonias de actinomicetos exhibieron características diferentes en los medios empleados, ya que el desarrollo y morfología de los microorganismos depende de las fuentes de carbono y nitrógeno que componen cada medio de cultivo. [62]

Basándose en las características morfológicas, y fisiológicas, todos los aislados fueron Gram positivos con micelio aéreo e inmóvil. El color de las colonias varió desde beige, blancas, amarillas y rosadas (Fig. 8, Tabla 5). Con la tinción de Gram se pudo identificar la morfología de las bacterias y el tipo de tinción mediante la observación microscópica utilizando el método descrito por Mora y García [63] La familia de actinobacterias están definidas como Gram positivas, es decir, que poseen una pared celular gruesa con varias capas interconectadas de peptidoglicano el cual tiene afinidad por el colorante cristal violeta de la tinción de Gram. [64]

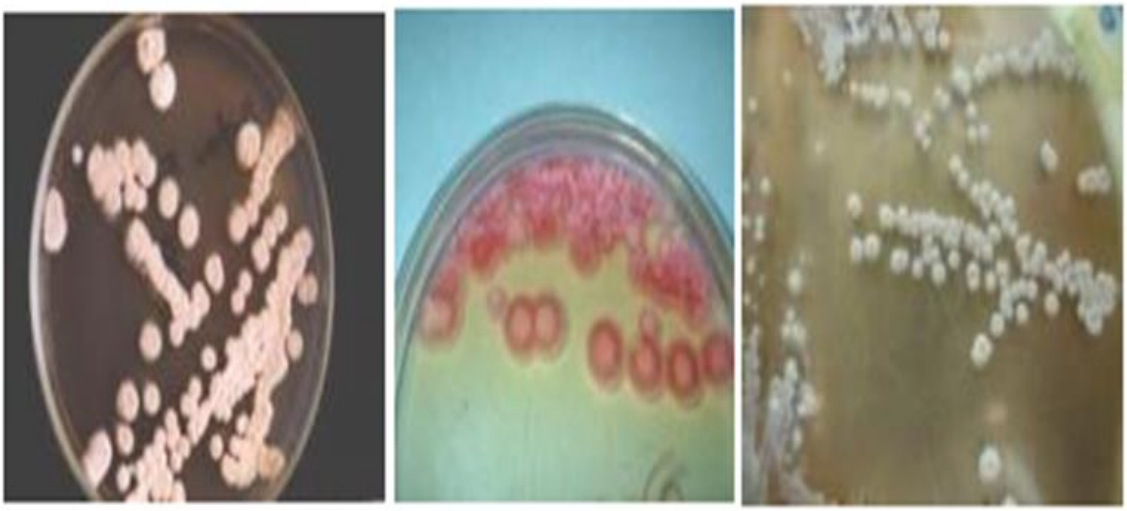

Figura 8. Aislados de actinomicetos procedentes de plantas endémicas de la región Central de Cuba, mostrando diferentes tonalidades de color blanco a beige y rosado. Los microorganismos fueron crecidos en medio de cultivo ACA por 7 días a 28 ºC.

Tabla 5. Propiedades morfológicas y fisiológicas de los actinomicetos aislados.

Aislados	Características de las colonias			Tinción Gram	Micelio aéreo	Esporas	Motilidad
	Color	Tamaño	Forma				
A1	Beige	Pequeña	Redonda	G+	+	+	-
A2	Blancas	Mediana	Redonda	G+	+	+	-
A3	Amarillas	Grande	Redonda	G+	+	+	-
A4	Rosadas	Pequeña	Redonda	G+	+	-	-
A5	Blancas	Mediana	Redonda	G+	+	-	-
A6	Beige	Grande	Redonda	G+	+	+	-

G+ = Gram positiva, + = Positiva/ Presente, -= Negativa/ Ausente

Las características bioquímicas determinantes para realizar la identificación en género de los Actinomicetos, se evaluaron con la aplicación de pruebas como la Catalasa, la Oxidasa, Hidrólisis de la Urea, Reducción de Nitratos, entre otras. A continuación, en la Tabla 6 se indica los resultados positivos y negativos en cada prueba bioquímica aplicada.

Tabla 6. Características bioquímicas de los actinomicetos aislados.

Prueba realizada	Cepas aisladas					
	A1	A2	A3	A4	A5	A6
Catalasa	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	+
Ureasa	+	-	+	-	+	+
Producción HS_2	+	-	+	-	+	+
Reducción nitrato	-	+	-	+	-	-
Rojo Metilo (19)	-	+	-	-	-	-
Voges-Proskaur (VP)	-	+	-	+	-	-
Utilización citrato	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis de Caseína	+	-	+	+	+	+
Almidón	+	-	+	-	+	+

Lípidos	+	-	+	-	+	+
Utilización de fuente de carbono						
D-glucosa	+	+	+	-	+	+
D-manitol	+	-	+	-	+	+
Fructuosa	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	-	+	+	+	+
Utilización fuente de nitrógeno						
D-alanina	+	+	+	+	+	+
L-arginina	+	+	+	+	+	+
L-tirosina	+	-	+	+	+	+

+ = reacción positiva, - = reacción negativa

En la prueba para determinar la presencia de catalasa, enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos, las seis cepas de actinomicetos mostraron formación de burbujas (Figura 9), lo que indica que sintetizan catalasa e hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso. [65]

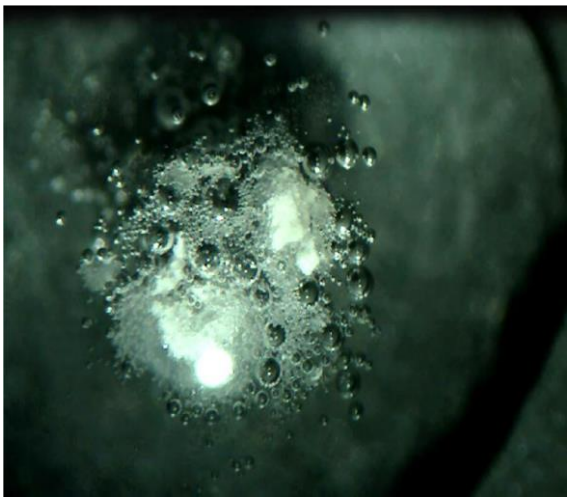

Figura 9. Prueba de catalasa en cepa A1 con resultado positivo observada bajo estereoscopio.

Se determinó la presencia de enzimas oxidasas, pues cuando hay presencia de un sistema citocromo-oxidasa la enzima oxidasa activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrógeno según la especie y en este estudio se obtuvo que, de las seis cepas aisladas, las seis mostraron resultados positivos, luego poseen la enzima oxidasa y pueden usar dioxígeno como último aceptor de electrones (Figura 10). [66]

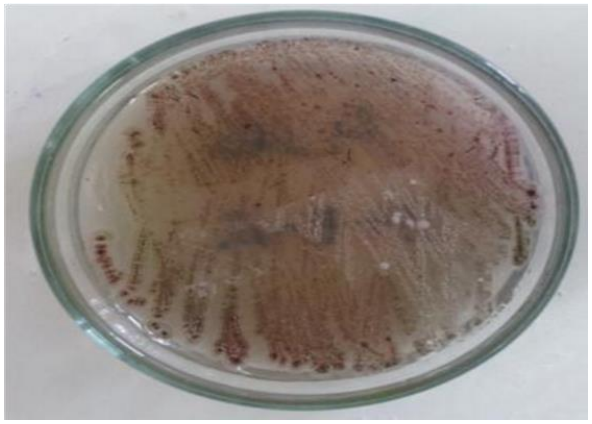

Figura 10. Prueba de oxidasa positiva pues aparece coloración violeta alrededor de la colonia a los pocos segundos.

La prueba para determinar la capacidad de estos microorganismos para degradar la urea mostró que cuatro de las seis cepas fueron capaces de producir la enzima ureasa, luego al producirse amoniaco que hará variar el color del indicador de amarillo a rojo, poniéndose así de manifiesto la actividad ureasa como se puede observar en la Figura 11.

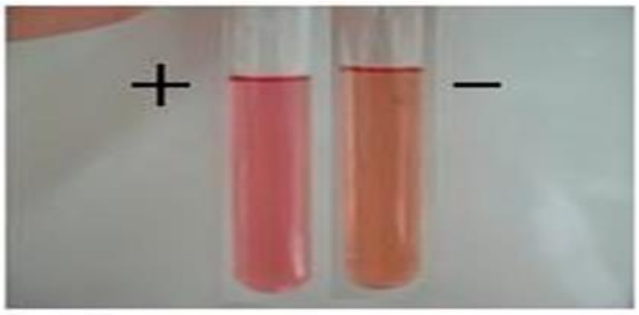

Figura 11. Prueba de hidrolisis de urea positivo al aparecer el color rosa

Los resultados obtenidos con relación a la morfología, fisiología y bioquímica revelaron que todas las cepas aisladas provenientes de las tres plantas evaluadas pertenecen al género *Streptomyces* sp., al ser bacterias Gram positivas, con ramificaciones extendidas en todo el substrato y micelio aéreo que forma cadenas desde tres a más esporas en cultivos maduros. Su apariencia en medios de cultivos sólidos fue granular, polvosa o aterciopeladas y pueden producir pigmentos de colores difusos. La mayoría de las especies utilizan una amplia gama de compuestos orgánicos como únicas fuentes de carbono para la energía y el crecimiento. La temperatura óptima de crecimiento para la mayoría de especies estuvo entre 28 y 30 °C, todo lo cual es considerado para la identificación preliminar de este género. **(67)**

Conclusiones

CONCLUSIONES

- Se aislaron treinta actinomicetos endófitos de las plantas endémicas de la región Central de Cuba *Eugenia clarensis* (Britton & P.Wilson), *Garcinia ruscifolia* var. ruscifolia (Clusiaceae) y *Hygrophila urquiolae*.

- Según la morfología, fisiología y bioquímica todas las cepas aisladas fueron Gram positivas con micelios aéreos e inmóviles y colores que variaron desde beige, blancas, amarillas hasta rosadas, características asociadas al género *Streptomyces* sp.

- De las cepas de actinomicetos aisladas, seis mostraron actividad antibacteriana contra al menos una de las cepas de referencia evaluadas, siendo los aislados A3 y A4 los que mostraron un amplio espectro de actividad.

Recomendaciones

RECOMENDACIONES

- Realizar la identificación hasta nivel de especie de las seis cepas que mostraron actividad antimicrobiana, utilizando técnicas de biología molecular.

- Determinar la actividad *in vitro* de las cepas A3 y A4 frente a patógenos clínicos.

Referencias Bibliográficas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Plus M. Resistencia a los antibióticos 2020
2. OMS. Resistencia antibióticos. 2020
3. León J, Aponte, J. J., Rojas, R., Cuadra, D. L., Ayala, N., Tomás, G., & Guerrero, M. . Estudio de actinomicetos marinos aislados de la costa central del Perú y su actividad antibacteriana frente a Staphylococcus aureus meticilina resistentes y Enterococcus faecalis vancomicina resistentes. Revista peruana de medicina experimental y salud pública. 2011:237-46.
4. Cornejo Avendaño JRRR, A. Resistencia antimicrobiana de bacterias cultivadas en la Unidad de Cuidados Intensivos de Adultos. Enfermedades Infecciosas y Microbiologicas. 2012;32:127-33.
5. Subramani R, & Sipkema, D. . Marine rare actinomycetes: a promising source of structurally diverse and unique novel natural products. Marine drugs. 2019;17(5): 249.
6. Yan LL, Han, N. N., Zhang, Y. Q., Yu, L. Y., Chen, J., Wei, Y. Z., Sun, C. H. Antimycin A 18 produced by an endophytic Streptomyces albidoflavus isolated from a mangrove plant. The Journal of Antibiotics. 2010;63(5):259-61.
7. Hong-Thao PT, Mai-Linh, N. V., Hong-Lien, N. T., Van Hieu, N. Biological characteristics and antimicrobial activity of endophytic Streptomyces sp. TQR12-4 isolated from elite Citrus nobilis cultivar Ham Yen of Vietnam. International journal of microbiology. 2016.
8. Sanghvi GV, Ghevariya, D., Gosai, S., Langa, R., Dhaduk, N., Kunjadia, P. D, Dave, G. S. . Isolation and partial purification of erythromycin from alkaliphilic Streptomyces werraensis isolated from Rajkot, India. Biotechnology Reports. 2014;1:2-7.
9. Badji B, Mostefaoui, A., Sabaou, N., Lebrihi, A., Mathieu, F., Seguin, E., Tillequin, F. Isolation and partial characterization of antimicrobial compounds from a new strain Nonomuraea sp. NM94. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2007;34(6):403-12.
10. Takahashi Y, Nakashima, T. Actinomycetes, an inexhaustible source of naturally occurring antibiotics. Antibiotics. 2018;7(2):45.
11. Pizano DGS. Microorganismos endófitos: origen y vida dentro de las plantas. revista Saber Más. 2017.
12. Dr.C. B. DibutI DCRM-V, Marisel Ortega, Ms.C. Yoania Ríos, Ms.C. Liuba Planas y Janet Rodríguez, Ms.C. Grisel Tejeda. Situacion actual y perspectiva de las relaciones endofíticas bacteria-planta. Cultivos tropicales revista scielo. 2019.
13. Perez C A, Johanna Rojas S, and Justo Fuentes C. Endophytes diversity of bacteria associated with roots of colosuana (bothriochloa pertusa) pasture in three locations of Sucre Department, Colombia. Acta Biologica Colombiana 2010;15(2):219-28.
14. Ortiz-Galeana MA, Hernández-Salmerón, J. E., Valenzuela-Aragón, B., Santos-Villalobos, S., Rocha-Granados, M. D. C., Santoyo, G. . Diversity of cultivable endophytic bacteria associated with blueberry plants (Vaccinium corymbosum L.) cv. Biloxi with plant growth-promoting traits. Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences, ex Agro-Ciencia. 2018;34(2):140-51.

15. Hernandez Calderón DA. Aislamiento y caracterización de bacterias endófitas asociadas a Puya goudotiana (Bromeliaceae) como antagonistas de Botrytis cinérea. Colombia, tesis 2019.
16. Gonzalez Pacheco C, Cruz Huaraya, M., Choque Gonzales, R. . Aislamiento de microorganismos endófitos de hojas de Physalis peruviana L. AGUAYMANTO. 2021.
17. JIANG Y, Qinyuan Li, Xiu Chen, Chenglin Jiang. Isolation and cultivation methods of Actinobacteria. Actinobacteria-basics and biotechnological applications. 2016:39-57.
18. NAFIS A, et al. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. Endophytic actinobacteria of medicinal plant Aloe vera: Isolation, antimicrobial, antioxidant, cytotoxicity assays and taxonomic study. . 2018;8(10):513.
19. PASSARI AK, Leo, V. V., Chandra, P., Kumar, B., Nayak, C., Hashem, A., Allah, E., Alqarawi, A., Singh, B. P. Bioprospection of actinobacteria derived from freshwater sediments for their potential to produce antimicrobial compounds. Microbial cell factories. 2018;17(1):1-14.
20. OUCHARI L, Boukeskasse, A., Bouizgarne, B., Ouhdouch, Y. . Antimicrobial potential of actinomycetes isolated from the unexplored hot Merzouga desert and their taxonomic diversity. Biology open. 2019;8(2).
21. PASSARI AK, et al. . Isolation, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants and screening for their in vitro antimicrobial biosynthetic potential. Frontiers in microbiology. 2015;6:273.
22. KUMAR PS, et al. In vitro antagonistic activity of soil Streptomyces collinus Dpr20 against bacterial pathogens. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 2021:317-24.
23. Gos FM, Savi, D. C., Shaaban, K. A., Thorson, J. S., Aluizio, R., Possiede, Y. M., ... & Glienke, C . Antibacterial activity of endophytic actinomycetes isolated from the medicinal plant Vochysia divergens (Pantanal, Brazil). . Frontiers in microbiology. 2017;8:1642.
24. SINGH M, et al. . Endophytic bacteria: a new source of bioactive compounds. 3 Biotech. 2017;7(5):1-14.
25. GOUDA S, et al. . Endophytes: a treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. Frontiers in microbiology. 2016;7:1538.
26. SINGH RD, Ashok K. . Diversity and applications of endophytic actinobacteria of plants in special and other ecological niches. . Frontiers in microbiology. 2018;9:1767.
27. CARO CASTRO J, et al. . Aislamiento y selección de actinomicetos rizosféricos con actividad antagonista a fitopatógenos de la papa (Solanum tuberosum spp. andigena). Ecología Aplicada. 2019;18(2): 101-9.
28. Perez. F. Actinomicetos aislados del compost y su actividad antagonista a fitopatogenos de la papa. revista mexicana de fitopatología. 2015:116-39.
29. PARADA RBM, Emilio Rogelio; VALLEJO, Marisol. Aislamiento y caracterización parcial de actinomicetos de suelos con actividad antimicrobiana contra bacterias multidrogo-resistentes. Revista Colombiana de Biotecnología. 2017:17-23.
30. GORRÍN LÓPEZ Y, et al. . Caracterización genética de actinomicetos aislados en suelos de Tenerife y evaluación de su potencial biotecnológico. 2018.

31. PRADA SALCEDO LD. Identificación de ácidos orgánicos causantes de la solubilización de fósforo inorgánico sintetizados por actinomicetos aislados de suelos en los Andes Orientales Colombianos.: Colombia; 2013.
32. GAO BG, Radhey S. Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria. Microbiology and molecular biology reviews. 2012:66-112.
33. Singh S, Kumar, P., Gopalan, N., Shrivastava, B., Kuhad, R. C., & Chaudhary, H. S. Isolation and partial characterization of actinomycetes with antimicrobial activity against multidrug resistant bacteria. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2012;2(2):S1147-S50.
34. GONZÁLEZ JYT. Los actinomicetos: Una visión como promotores de crecimiento vegetal.: Universidad Javeriana; 2010.
35. M. G. Antibióticos y nuevas terapias para combatir las enfermedades infecciosas. Revista Medicina y Ciencias de la Salud. 2019.
36. SÁNCHEZ EGEA A. Desarrollo de antibióticos a partir de actinobacterias del medio marino.: España; 2019.
37. Hidalgo BF, Noa, I. C., Köster, N., Monzón, A. N., & Borsch, T. Reporte de una expedición botánica a la provincia de Villa Clara, Cuba/Report on a botanical expedition to Villa Clara province, Cuba. Revista del Jardín Botánico Nacional. 2013:29-41.
38. ICN. JARE. Caracterización de la flora sobre serpentina al norte de la provincia de Sancti Spíritus, Cuba. Acta cubana de botánica. 2017.
39. Avalos A. Contribución al estudio fitoquímico y farmacológico de la especie *Eugenia clarensis* Britton & P. Wilson. Cuba: Universidad Central" Marta Abreu" de Las Villas.; 2017.
40. López A. Diversidad de la flora endémica de Cuba 10:136-63.
41. Falcón B, Castañeda I, Koster N, Noa A and Borsh Th. Reporte de una expedición botánica a la provincia de Villa Clara, Cuba. Revista del Jardín Botánico Nacional RNPS. 2014;35-34: 29-41.
42. Krishnakumar S. Isolation and Standardization of antimicrobial compounds from sponge associated antagonistic actinomycetes. India: Manonmaniam Sundaranar University.; 2005.
43. Williams ST, and T. . Cross. "Chapter XI actinomycetes." Methods in microbiology. Academic Press.4: 295-334.
44. Ganesan P, Reegan, A. D., David, R. H. A., Gandhi, M. R., Paulraj, M. G., Al-Dhabi, N. A., & Ignacimuthu, S GANESAN, Pathalam, et al. Antimicrobial activity of some actinomycetes from Western Ghats of Tamil Nadu, India. Alexandria journal of medicine. 2017;53(2):101-10.
45. Zainal Abidin ZA, Abdul Malek, N., Zainuddin, Z., & Chowdhury, A. J. K. . Selective isolation and antagonistic activity of actinomycetes from mangrove forest of Pahang, Malaysia. Frontiers in Life Science. 2016;9(1):24-31.
46. Arasu MV, Duraipandiyan, V., Agastian, P., & Ignacimuthu, S. In vitro antimicrobial activity of Streptomyces spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). Journal de Mycologie Médicale. 2009;19(1):22-8.
47. Eccleston GP, Brooks, P. R., & Kurtböke, D. I. The occurrence of bioactive micromonosporae in aquatic habitats of the Sunshine Coast in Australia. Marine drugs. 2008;6(2):243-61.

48. Dhanasekaran D, Thajuddin, N., & Panneerselvam, A. An antifungal compound: 4′ phenyl-1-napthyl–phenyl acetamide from Streptomyces sp. DPTB16. Facta Universitatis Ser Med Biol. 2008;15(1): 7-12.
49. Reddy NG, Ramakrishna, D. P. N., & Raja Gopal, S. V. A morphological, physiological and biochemical studies of marine Streptomyces rochei (MTCC 10109) showing antagonistic activity against selective human pathogenic microorganisms. . Asian J Biol Sci. 2011;4(1): 1-14.
50. Williams ST, and T. . Cross. "Chapter XI actinomycetes." Methods in microbiology. Academic Press.4: 295-334.
51. Bailón L, Roberto González, and Armando Cervantes. . Atlas de pruebas bioquímicas para identificar bacterias. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza: Universidad Nacional Autónoma de México; 2003.
52. Garrity GM. Bergey's Manual Trust, Department of Microbiology and Molecular Genetics. 2005,;2.
53. Shenpagam HN, Devi, D. K., Sinduja, G., & Sandhya, R. . Isolation of endophytic actinomycetes from medicinal plants and its mutational effect in biocontrol activity. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2012;3(11): 4338.
54. Gil SV, S. Pastor, and G. J. March. . Quantitative isolation of biocontrol agents Trichoderma spp., Gliocladium spp. and actinomycetes from soil with culture media. Microbiological research. 2009;164(2):196-205.
55. Kouadri F, Amal Al-Aboudi, and Hala Khyami-Horani. Antimicrobial activity of Streptomyces sp. isolated from the gulf of Aqaba-Jordan and screening for NRPS, PKS-I, and PKS-II genes. African Journal of Biotechnology. 2014;13(34).
56. Fguira LFB, Fotso, S., Ameur-Mehdi, R. B., Mellouli, L., & Laatsch, H. . Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated Streptomyces sp. strain US80. . Research in Microbiology. 2005;156(3):341-7.
57. Pérez A, Rojas, J., y Fuentes, J. Diversidad de bacterias endófitas asociadas a raíces del pasto Colosuana (Bothriochloa pertusa) en tres localidades del departamento de Sucre,. Colombia Acta biológica colombiana. 2010;15(2).
58. Elsayed TR, Galil, D. F., Sedik, M. Z., Hassan, H. M., & Sadik, M. W. . Antimicrobial and anticancer activities of actinomycetes isolated from Egyptian soils. Journal homepage: http://www ijcmas com. 2020;9(9).
59. Bukhari SI, Hamed, M. M., Al-Agamy, M. H., Gazwi, H. S., Radwan, H. H., & Youssif, A. M. . Biosynthesis of copper oxide nanoparticles using Streptomyces MHM38 and its biological applications. Journal of Nanomaterials. 2021.
60. Panwar D, et al. . Antagonistic activity of soil actinomycetes against common human pathogens. . Int J Pharm Biosci. 2012;3:500-6.
61. Guevara BL. Aislamiento y caracterización morfológica de cepas nativas de actinomicetos y su actividad antagónica contra Ralstonia solanacearum, Escherichia coli, Staphylococcus aureus y Salmonella sp: Honduras; 2017.
62. Franco Correa M. Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas.: Universidad de Granada; 2008.
63. Mora N y García A. Supervivencia de actinomicetos a diferentes temperaturas. En química de alimentos. UAEH. Pachuca2007.

64. Chen X J, Y., Li, Q., Han, L., & Jiang, C. . Molecular phylogenetic identificaction of actinobacteria. In D. Dharumadurai, & Y. Jiang, Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications China: INTECH. 2016.
65. Aquiahuatl Ramos Md P, M. . Manual de prácticas del laboratorio de microbiología general. . Iztapalapa: Universidad Autónoma Metropolitana 2004.
66. Holt JG, Noel R. Krieg, and Peter HA Sneath. . Bergey's manual of determinative bacterology. 2013.
67. You JL, Cao, L. X., Liu, G. F., Zhou, S. N., Tan, H. M., & Lin, Y. C. Isolation and characterization of actinomycetes antagonistic to pathogenic Vibrio spp. from nearshore marine sediments. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2005;21(5):679-82.